

(51) Int.Cl.⁸

A 61 K 47/48

識別記号

庁内整理番号

F I

Z 7433-4C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全120頁)

(21) 出願番号 特願平6-517355

(86) (22) 出願日 平成6年(1994)1月26日

(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)7月28日

(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 4 / 0 1 0 3 4

(87) 国際公開番号 W O 9 4 / 1 6 7 0 6

(87) 国際公開日 平成6年(1994)8月4日

(31) 優先権主張番号 0 8 / 0 1 1 , 6 6 9

(32) 優先日 1993年1月28日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), C A, J P

(71) 出願人 ネオルックス コーポレーション

アメリカ合衆国, ワシントン 98119, シ
アトル, ウエスト ハリソン 410

(72) 発明者 クンツ, ローレンス リロイ

アメリカ合衆国, ワシントン 98053, レ
ッドモンド, ノースイースト, トゥーハン
ドレッド サーティーフィフス プレイス
1822

(72) 発明者 クレイン, リチャード エー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98037, ラ
インウッド, サウスウエスト, ワンハンド
レッド シックスティセカンド プレイス
6620

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 血管平滑筋細胞の治療用インヒビター

(57) 【要約】

血管筋肉細胞の細胞活性を阻害する治療剤投与形に結合される、その筋肉細胞の細胞表面に特異的な態様で関連する血管平滑筋結合タンパク質を含む治療用接合体の治療的な有効量を宿主に投与することを含んで成る、哺乳類宿主における血管損傷又は疾患に続く狭窄症を阻害するための方法が提供される。平滑筋細胞収縮を阻害することによって、すなわち生物学的ステントを構成することによって、血管内腔の拡張及び固定化を引き起こす血管平滑筋細胞に治療剤の直接的且つ/又は標的化された供給のための方法がまた、提供される。

【特許請求の範囲】

1. 伸張欠陥管腔面積を保持するのに十分な時間、正常哺乳類平滑筋細胞の1つ又はそれ以上の病理学的活性を阻害する方法であって、血管平滑筋細胞の1つ又はそれ以上の病理学的活性を阻害する有効量の細胞増殖抑制治療薬を哺乳類に投与し、治療薬が外傷欠陥に直接又は間接的に投与される方法。

2. 投与工程がカテーテルを用いて達成される請求の範囲第1項記載の方法。

3. 治療薬が細胞骨格阻害剤又はその類似体である請求の範囲第1項記載の方法。

4. 細胞骨格阻害剤がサイトカラシンB、サイトラカシンC、サイトカラシンD又はその類似体である請求の範囲第3項記載の方法。

5. 血管平滑筋細胞の1つ又はそれ以上の病理学的活性を阻害する有効量の細胞増殖抑制治療薬をその中に分散された持続性放出投与形態を引き続き投与する工程をさらに包含する請求の範囲第1項記載の方法。

6. 持続性放出投与形態が、血管平滑筋細胞周囲の血管平滑筋細胞、間質細胞又は間隙マトリックスに特異的に局限し得る共有結合ペプチド又はタンパク質で被覆される請求の範囲第5項記載の方法。

7. 伸張欠陥管腔面積を保持するのに十分な時間、正常哺乳類平滑筋細胞の1つ又はそれ以上の病理学的活性を阻害する方法であって、以下の：

血管平滑筋細胞周囲の血管平滑筋細胞、間質細胞又は間隙マトリックスに特異的に局限し得る殺細胞剤結合パートナーを包含する殺

細胞接合体；並びに

血管平滑筋細胞の1つ又はそれ以上の病理学的活性を阻害する有効量の細胞増殖抑制治療薬をその中に分散された持続性放出投与形態であって、血管平滑筋細胞周囲の血管平滑筋細胞、間質細胞又は間隙マトリックスに特異的に局限し得る共有結合ペプチド又はタンパク質で被覆される持続性放出投与形態を哺乳類に投与することを包含する方法。

8. 殺細胞剤が毒素又は毒素サブユニットを包含し、治療薬がタンパク質キナーゼ阻害剤、細胞骨格阻害剤、TGF-β受容体、その類似体、TGF-β受容体活性化剤、

又はTGF-ベータ産生刺激剤である請求の範囲第7項記載の方法。

【発明の詳細な説明】**血管平滑筋細胞の治療用インヒビター****発明の分野**

本発明は、とくに状態、例えば、血管の外傷または疾患後の狭窄、脾細胞の機能亢進または過形成から生ずる疾患および免疫系のエフェクター細胞により仲介される疾患を処置のために、ある種の標的細胞の集団、例えば、平滑筋細胞、癌細胞、疾患の状態を改善するために変調を必要とする体細胞および免疫系のエフェクター細胞に対して向けられた結合相手の外科的または静脈内導入を包含する治療方法に一般に関する。平滑筋のタンパク質の増殖または移動または収縮を変更することができる活性化剤の外科的または静脈内導入を、また、記載する。本発明は、また、血管の管腔の拡張または固定を生ずる（生物学的ステンティング（stenting）作用）血管平滑筋細胞への治療剤の直接または標的放出に関する。また、細胞破壊性接合体および血管平滑筋細胞のインヒビターの持続放出投与形態の組み合わせた投与を開示する。

発明の背景

経皮的経管腔的冠状血管形成（PTCA）は、冠状動脈の疾患をもつ多数の患者において主要な処置の物理療法として広く使用されている。この外科的処置は急速成長し、1983年に39,000の処置が実施され、1987年に150,000の処置が実施され、1988年に250,000の処置が実施され、そして1994年までに500,000PTCA／年を超えることが推定される。PTCA後の狭窄は有意な問題を残し、患者の25％～35％は1～3月以内に再狭窄を発生している。再狭窄は有意な罹病率お

よび死亡率を生じ、そしてしばしばそれ以上の関与、例えば、反復した血管形成または冠状バイパス手術を必要とする。外科的関与または手術後の処置（今日まで）は再狭窄の予防において有効であることが証明された。

PTCA後の狭窄の原因となるプロセスは完全には理解されないが、いくつかの異なる生物学因子および経路の間で複雑な相互作用から生ずることがある。組織学的断面で見ると、病変は血管の内膜層の中に平滑筋細胞の異常増殖を有することがある（3）。PTCA後の平滑筋細胞の増殖についてのいくつかの可能なメカニズ

ムは示唆するされてきている(1, 2, 4, 5)。

生体外で望ましくない平滑筋の増殖を抑制すると報告されている化合物(4, 5, 6)は、生体内で使用するとき、望ましくない薬理学的副作用を有することがある。ヘパリンは1つのこのような例であり、生体外で平滑筋細胞の増殖を阻害すると報告されているが、生体内で使用するとき、凝固を阻害するという潜在的悪い副作用を有する。ヘパリンのペプチドは、抗凝固剤活性が減少しているが、短い薬理学的半減期を有するという望ましくない薬理学的性質を有する。二重バルーンカテーテルを使用することによって、すなわち、血管形成部位における治療剤の領域的放出について、そして薬物を含浸された生物分解性物質を使用することによって、すなわち、短い半減期の問題を補償するために、このような問題を解決する試みがなされた(例えば、9; 米国特許第4,929,602号)。

ペルカリン類(Verrucarins)およびロリジン類(Roridins)は、上の真菌ミロセリシウム・ペルカリア(Myrothecium Verrucaria)およびミロセリシウム・ロリジウム(Myrothecium roridium)により二次代謝物として産生されるトリコテセン薬物である。ペルカリンは巨大環トリエステルである。ロリジンはペルカロールの巨大環

ジエステルである。グループとして、トリコテセンは真菌のいくつかの種により産生されるセスキテルペノイドマイコトキシン類に構造的に関係し、そして12, 13-エポキシトリコテケ-9-エンの基本構造により特徴づけられる。真核細胞に対するそれらの細胞障害性活性は、細胞に結合し、内在化し、そして細胞中のタンパク質および高分子の合成を阻害するそれらの能力と密接に相関関係する。

少なくとも5つの考察が、それらの面上に、平滑筋細胞の異常増殖から生ずる狭窄を予防するために阻害剤の使用を排除するように思われる。第1に、阻害剤は心臓血管の疾患をもつ患者について許容されえないレベルの危険をつくることのできる全身的毒性を有することがある。第2に、阻害剤は手術後の血管の創傷の治療を妨害することがあり、そしてそれは治療を遅延するか、あるいは新しく治療した血管壁の構造または弾性を弱化することがある。第3に、平滑筋細胞を殺す阻害剤は取り囲む内皮および/または他の内側平滑筋細胞を損傷することが

ある。死亡した細胞および死亡する細胞は、また、追加の平滑筋細胞の増殖を刺激しかつ狭窄を再燃させることがある分裂促進剤を放出する。第4に、阻害剤の治療効果のレベルの放出はいくつかの観点から問題となることがある：すなわち、a) 平滑筋細胞の間の細胞間空間の中への多数の分子の放出は、すなわち、治療的に有効投与量の分子が細胞膜を横切るようにさせるために好適な状態を確立するために必要である；b) 適切な細胞内隔室の中に阻害薬物に向けることは、すなわち、その作用が発揮される場合、コントロールすることが困難である；そしてc) 阻害薬物とその細胞内標的、例えば、リボソームとの連合を最適化すると同時に、例えば、付近の細胞への、薬物の細胞間の再分布を最小とすることは困難であることがある。第5に、平滑筋細胞の増殖は数週にわたって起こるので、有益な作用を生成するために、多分速

続的に、阻害薬物をまた数週にわたって投与すべきであるように推定的に思われる。

以上から明らかなように、平滑筋細胞の増殖を効果的に処置するために、細胞障害性剤を包含する、阻害薬物の使用において解決すべき多数の問題が残っている。血管の手術の間に起こるような血管への外傷性障害後の血管平滑筋細胞の増殖のための狭窄を抑制する新規な方法を開発することは高度に有利であろう。さらに、延長した期間の抑制を生成する化合物の血管平滑筋細胞への放出は有利であろう。このような持続放出性化合物の局所的投与は、また、標的細胞の集団がこのような投与によりアクセス可能である他の状態の処置において有用であろう。

発明の要約

本発明の1つの面において、哺乳動物宿主において血管平滑筋細胞を阻害する新規な治療方法および治療接合体が提供される。治療接合体は、血管平滑筋細胞の細胞膜に特定の方法で結合する血管平滑筋結合性タンパク質またはペプチド、あるいは動脈壁のその間質マトリックス（例えば、コラーゲン）に特定の方法で結合し、細胞の活性を阻害する治療剤にカップリングした、間質マトリックス結合性タンパク質／ペプチドを含有する。1つの態様において、細胞の活性の阻害

は、血管形成または他の血管手術法後の狭窄の減少、遅延または排除を生ずる。本発明の治療接合体は、血管平滑筋細胞および、平滑筋細胞の中に転移することのできる、血管周囲細胞に連合することによって、これらの有利な作用を達成する。治療接合体は次のものを含有する：（１）細胞の代謝を変更するか、あるいはタンパク質合成、細胞の増殖、または細胞の移動のインヒビターである治療剤；（２）形態に影響を与えるか、あるいは細胞体積を

増加する、微小管およびマイクロフィラメントのインヒビター；および／または（３）細胞外マトリックスの合成または分泌のインヒビター。１つの代表的態様において、接合体はセスキテルペノイドマイコトキシンである細胞障害性治療剤、例えば、ベルカリンまたはロリジンを含む。他の態様は、投与量においてDNA合成または増殖を阻害し、タンパク質合成に対して最小の作用を有する静細胞性治療剤、例えば、タンパク質キナーゼインヒビター（例えば、スタウロsporin）、スラミン、および酸化窒素解放化合物（例えば、ニトログリセリン）またはそれらの類似体または機能的同等体を包含する。さらに、平滑筋細胞の収縮または移動を阻害しそして、例えば、血管形成外傷後の、拡大した管腔区域を維持する治療剤（例えば、サイトカラシン類、例えば、サイトカラシンB、サイトカラシンC、サイトカラシンDなど）を、また、本発明による使用のために考えられる。本発明の他の面は、血管平滑筋細胞の膜上の発現されるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）に特異的に連合する血管平滑筋結合性タンパク質に関し、そして好ましい態様において、このCSPGは約250kDaの分子量を有する。好ましい態様において、血管平滑筋結合性タンパク質は、少なくとも 10^{-4} Mの連合定数で細胞表面上のCSPG標的に結合する。他の好ましい態様において、血管平滑筋結合性タンパク質はモノクローナル抗体NR-AN-01またはその機能的同等体のFab、FvまたはCDR（相補性決定領域）の中に見出されるアミノ酸配列を含有する。

本発明の他の面は、処置を必要とするヒトまたは動物の被検体に治療的に有効な投与量の本発明の治療接合体を投与することによって、哺乳動物宿主における、例えば、血管形成後の、狭窄を阻害する方法を包含する。１つの代表的態様において、前記投与量の治療接合体を、注入カテーテルで投与して、血管中の投与部

位においてス

ーパーオキシドジスムターゼ治療接合体の 10^{-3} M $\sim 10^{-12}$ Mの濃度を達成することができる。

本発明は、また、標的細胞に治療剤を持続的に解放することを含む治療方法および治療投与の形態を考える。好ましくは、標的細胞は血管平滑筋細胞、癌細胞、疾患を改善するために変調を必要とする体細胞および投与形態の局所的投与によりアクセス可能である免疫系仲介疾患に関係する細胞である。結局、本発明のこの面の方法および投与形態は、細胞の活性（例えば、増殖、収縮、移動など）を阻害するが、細胞および血管平滑筋結合性タンパク質を殺さない治療剤を使用する、哺乳動物宿主における血管平滑筋細胞の阻害のために有用である。また、本発明のこの面の方法および投与形態は、標的細胞および標的細胞結合性タンパク質の増殖を阻害するか、あるいはそれらに対して細胞障害性である治療剤を使用する、標的細胞の増殖を阻害するか、あるいはこのような標的細胞を殺すために有用である。さらに、本発明のこの面の方法および投与形態は、標的細胞結合性タンパク質を使用する、投与形態の局所的投与によりアクセス可能である、標的細胞、例えば、免疫系のエフェクター細胞に、静細胞性、細胞破壊性または代謝変調性の治療剤を放出するために有用である。最後に、本発明の投与形態は、正常組織（すなわち、体細胞）の病理学的増殖または機能亢進を減少または排除するために有用である。

本発明の投与形態は、好ましくは非分解性の微小粒子またはナノ粒子あるいは生物分解性の微小粒子またはナノ粒子あるいはである。より好ましくは、微小粒子またはナノ粒子は、ランダム、非酵素的、加水分解性の切断により生物分解するマトリックスを包含するポリマーから形成される。とくに好ましい構造体は、熱可塑性ポリエステル（例えば、ポリラクチドまたはポリグリコリド）の混合物

あるいはラクチドまたはグリコリド成分のコポリマーから形成される。ラクチド／グリコリド構造体は、それらの生物分解が、両方共哺乳動物の正常の産生物である、乳酸およびグリコール酸を形成するという付加された利点を有する。

微小粒子またはナノ粒子内に分散した好ましい治療剤は、治療的に有意な標的細胞を殺さないで標的細胞の阻害、あるいは標的細胞を殺す活性を示すものである。血管平滑筋細胞の再狭窄の処置のために、有用な治療剤は標的細胞を殺さないで標的細胞の活性（例えば、増殖または移動）を阻害する。この目的に好ましい治療部分は、タンパク質キナーゼインヒビター（例えば、スタウロスポリンなど）、平滑筋移動および／または収縮インヒビター（例えば、サイトカラシン類、例えば、サイトカラシンB、サイトカラシンC、サイトカラシンDなど）、スラミン、および酸化窒素解放化合物、例えば、ニトログリセリン、あるいはそれらの類似体または機能的同等体である。癌の治療において、有用な治療剤は増殖を阻害するか、あるいは標的細胞に対して細胞障害性である。この目的に好ましい治療部分はロリジンAおよびシュードモナス・エキソトキシン（*Pseudomonas exotoxin*）、それらの類似体または機能的同等体である。免疫系仲介疾患、例えば、関節炎の処置のために、有用な治療剤は、静細胞性、細胞破壊性または代謝仲介性の治療剤を、投与形態の局所的投与によりアクセス可能である標的細胞を放出する。この目的に好ましい治療部分は、ロリジンA、シュードモナス・エキソトキシン（*Pseudomonas exotoxin*）、スラミンおよびタンパク質キナーゼインヒビター（例えば、スタウロスポリン）、スフィンゴシン、あるいはそれらの類似体または機能的同等体である。病理学的に増殖する正常組織（例えば、増殖性硝子体網膜症、角膜パンスなど）の処置のために、抗増殖剤または抗移動剤は好ましい（例

えば、サイトカラシン類、トキソール、ソマトスタチン、ソマトスタチン類似体、N-エチルマレイミド、アンチセンスオリゴヌクレオチド類など）。

本発明の投与形態は、結合性タンパク質またはペプチドにより関係する標的細胞の集団にターゲティングされる。本発明の好ましい結合性タンパク質／ペプチドは、血管平滑筋結合性タンパク質、腫瘍細胞結合性タンパク質および免疫系エフェクター細胞結合性タンパク質である。好ましい血管平滑筋結合性タンパク質は血管平滑筋細胞の膜上で発現されたコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）に特異的に連合し、そして好ましい態様において、このCSPGは約250kDaの

分子量を有する。好ましい態様において、血管平滑筋結合性タンパク質は、少なくとも 10^{-4} Mの連合定数で細胞表面上のCSPG標的に結合する。他の好ましい態様において、血管平滑筋結合性タンパク質はモノクローナル抗体NR-AN-01またはその機能的同等体のFab, FvまたはCDR（相補性決定領域）の中に見出されるアミノ酸配列を含有する。本発明のこの態様において有用な他の好ましい結合性タンパク質は、細胞間支質および血管平滑筋細胞の間に位置するマトリックスに局在化するものを包含する。この型の好ましい結合性タンパク質は、特別にコラーゲン、細網状繊維または他の細胞間マトリックス化合物に連合する。好ましい腫瘍細胞の結合性タンパク質は標的腫瘍細胞の集団またはそれらの細胞質エピトープにより発現された表面細胞マーカーに連合する。好ましい免疫系変調標的細胞結合性タンパク質は、標的免疫系エフェクター細胞またはそれらの細胞質エピトープの細胞表面マーカーに連合する。本発明の結合性ペプチド／タンパク質は、また、病理学的に増殖する正常組織をターゲティングする。

本発明は、また、遊離の（すなわち、非ターゲティングまたは

非結合性相手が連合しない）治療剤を標的細胞に投与することを包含する治療法および治療投与形態を提供する。好ましくは、標的細胞は血管平滑筋細胞であり、そして治療剤は血管平滑筋細胞の収縮のインヒビターであり、正常の静水圧が血管管腔を拡張できるようにする。このような収縮阻害はアクチンの阻害により達成することができ、これは好ましくはタンパク質合成の阻害に必要であるより低い投与レベルで達成および持続が可能である。結局、血管平滑筋細胞は小さい細胞外傷を修復しかつ間質マトリックスを分泌するために要求されるタンパク質を合成し、これによりその最大の収縮直径に近い拡張した状態で血管管腔の固定を促進する。この現象は、初期の処置後の血管造影図に基づいて成功したと分類された血管形成処置の25%までにおいて起こる、望ましくない反動（recoil）機構を減少または防止する生物学的ステントング効果を構成する。サイトカラシン類（これらはG～Fアクチンの重合を阻害し、そしてこれらのアクチンは血管平滑筋細胞の移動または収縮を阻害する）は、本発明のこの態様において使用するための好ましい治療剤である。この型の遊離の治療剤のプロトコールは血

管形成または他の血管外科的処置後の狭窄を減少、遅延または排除する。好ましくは、遊離の治療剤は血管平滑筋組織に直接または実質的に直接投与される。このような投与は好ましくは注入カテーテルにより実施して、血管の投与部位において前記治療剤の 10^{-3} M $\sim 10^{-12}$ Mの濃度を達成する。

本発明の他の態様は、血管狭窄に関係する増殖する血管平滑筋細胞を破壊するために、細胞破壊性ターゲットド接合体を投与することを包含する。この生物学的動脈筋切除後に解放される分裂促進剤は、本発明の抗収縮（抗移動）または抗増殖性の持続解放剤の投与により、残留する生存能力のある血管平滑筋細胞を刺激して増殖さ

せかつ血管を再狭窄するのを防止される。

図面の説明

図1は、血管平滑筋結合性タンパク質が細胞表面および膜に結合した24歳の男性の患者の動脈中の血管平滑筋細胞の顕微鏡写真である。動脈組織を組織学について準備する前の4日にi. v. 投与により、患者に血管平滑筋結合性タンパク質を投与した。

図2は、血管平滑筋結合性タンパク質への治療剤の化学的カップリングの第1概要を描写する。

図3は、血管平滑筋結合性タンパク質への治療剤の化学的カップリングの第2概要を描写する。

図4Aは、生体外のマーカー陽性被験細胞への血管平滑筋結合性タンパク質の急速な結合を示す実験データをグラフで描写する。

図4Bは、血管平滑筋細胞への血管平滑筋結合性タンパク質の急速な結合を示す実験データをグラフで描写する。

図5Aは、血管平滑筋細胞を生体外で24時間処理したとき、低いレベルの治療接合体（すなわち、RA-NR-AN-01）および遊離RA治療剤の望ましくない細胞障害性を示す実験データをグラフで表す。

図5Bは、マーカー陽性および陰性の細胞の代謝活性へのRA-NR-AN-01治療剤の作用を示す実験データをグラフで表す。これらのデータは生体外の24時間の

処理におけるすべてのこれらの細胞についての接合体の望ましくない非特異的細胞障害性を示す。非特異性は、試験した細胞を遊離の薬物へ暴露するカップリングリガンドの細胞外加水分解から生ずる。

図 6 A は、24 時間の処理後に一夜の回復期間を置いて代謝活性を試験してさえ、生体外の 24 時間の処理後におけるマーカー陽性およびマーカー陰性の被験細胞についての PE-NR-AN-01 治療接合体の

望ましくない非特異的細胞障害性を示す実験データをグラフで描写する。

図 6 B は、生体外の 24 時間の処理後のマーカー陽性およびマーカー陰性の被験細胞についての遊離 PE 治療剤の非特異的細胞障害性を示す実験データを描写する。

図 7 A は、短い 5 分の「パルス」処理、すなわち、24 時間の代わりに、次いで [3 H] ロイシンへの暴露を示す実験データをグラフで表し、遊離の RA 治療剤は非特異的に細胞障害性であり、すなわち、対照の HT29 マーカー陽性細胞について、しかし、対照的に、RA-NR-AN-01 治療接合体はこの「パルス」処理において細胞障害性ではないことを示す実験データをグラフで表す。

図 7 B は、遊離の RA 治療剤は、5 分「パルス」処理および引き続き [3 H] ロイシンへの暴露前の 24 時間の回復期間においてさえ、対照 HT29 マーカー陰性細胞について非特異的に細胞障害性であるが、対照的に、RA-NR-AN-01 治療接合体は細胞に対して細胞障害性ではないことを示す実験データをグラフで表す。

図 7 C は、RA-NR-AN-01 治療接合体を使用する生体外の細胞の「パルス」処理が、タンパク質合成により測定して、マーカー陽性 A375 細胞において細胞活性を阻害することを示す実験の結果をグラフで表す。

図 7 D は、A375 細胞におけるタンパク質合成は、細胞を生体外の試験前に一夜の回復期間に付したとき、阻害されなかったので、RA-NR-AN-01 治療接合体を使用する生体外の細胞の「パルス」処理がマーカー陽性細胞において細胞活性に対して長く続く阻害作用を発揮しなかったことを示す実験データをグラフで表す。

図 8 A は、遊離 RA 治療剤を使用する生体外の細胞の「パルス」処理は非特異的

に細胞障害性であったが、試験前に48時間の回復期間

に付したB054細胞における代謝活性により証明されるように、血管平滑筋細胞における細胞活性に対して長く続く阻害作用を発揮しなかったことを示す実験データをグラフで表す。

図8Bは、上の図8Aに表すものに類似する実験データをグラフで描写するが、第2マーカー陽性細胞の型、すなわち、A375を使用すると、RA-NR-AN-01治療接合体を使用する「パルス」処理は、試験前に48時間の回復期間に付したA375細胞における代謝活性により証明されるように、細胞活性に対して長く続く阻害作用を発揮しなかったことをデータは示す。

図8Cは、上の図8Aおよび図8Bに表すものに類似する結果をグラフで描写するが、マーカー陰性対照細胞の型、すなわち、HT29を使用する。結果が示すように、RA-NR-AN-01治療接合体を使用する「パルス」処理は、試験前に48時間の回復期間に付したHT29細胞における代謝活性により証明されるように、マーカー陰性対照細胞の細胞活性に対して長く続く阻害作用を発揮しなかった。

図9Aは、動物モデルにおける血管形成後5週における未処置の組織学的切片における内膜の平滑筋細胞の増殖のための狭窄を示す。

図9Bは、動物モデルにおける血管形成後5週における治療接合体で処置した動脈の組織学的切片における狭窄の抑制を示す。

図10Aは、スラムのタンパク質合成およびDNA系の阻害を血管平滑筋細胞に関して比較する実験データをグラフで描写する。

図10Bは、スタウロスポリンのタンパク質合成およびDNA系の阻害を血管平滑筋細胞に関して比較する実験データをグラフで描写する。

図10Cは、ニトログリセリンのタンパク質合成およびDNA系の阻害を血管平滑筋細胞に関して比較する実験データをグラフで描写す

る。

図11は、62,500倍に拡大しそしてそれらのいくつかが細胞により生体外で内在化されているプロセスにおける抗体被覆金ビーズを含有する多数のエンドサイト

ーシスの小胞により特徴づけられる平滑筋細胞の内表面に対して平行の接線方向の断面を示す。

図12は、62,500倍に拡大しそして生体外で金ビーズに細胞を暴露した後24時間におけるリソソーム中の金ビーズの顕著な蓄積により特徴づけられる平滑筋細胞を示す。

図13は、62,500倍に拡大しそして生体内のリソソーム中の金ビーズの蓄積により特徴づけられる平滑筋細胞を示す。

図14は、ブタの大腿動脈の管腔区域へのサイトカラシンBの作用の生体内の投与量応答の研究を描写する。

発明の詳細な説明

ここにおいて使用するとき、次の用語は後述するような意味を有する：

「治療接合体」は、治療剤にカップリングした（例えば、必要に応じてリンカーを通して）血管平滑筋または間質マトリックスの結合性タンパク質を意味する。

「標的」および「マーカー、マトリックスまたは血管平滑筋の結合性タンパク質」により特定の方法で認識される分子、例えば、抗原、ポリペプチド抗原あるいは血管平滑筋細胞またはマトリックス構造体の細胞表面膜上に発現される細胞表面の炭水化物（例えば、グリコリピド、糖タンパク質、またはプロテオグリカン）を記載するとき、互換的に使用される。

「エビトープ」は、マトリックスまたは平滑筋の結合性タンパク質により結合される「標的」分子内の特定の部位、例えば、3 また

はそれ以上のアミノ酸の配列または糖類を意味する。

「カップリングした」は、マトリックスまたは血管平滑筋の結合性タンパク質と治療剤との共有結合または非共有結合の化学的連合（すなわち、ファンデルワールス力または電荷-電荷の相互作用によるような疎水性）を意味するために使用する。使用する治療剤の特質のために、結合性タンパク質は通常共有結合により治療剤と連合する。

「リンカー」は、マトリックスまたは平滑筋の結合性タンパク質を治療剤にカ

ップリングさせる物質、例えば、有機化学のカップラーを意味する。

平滑筋細胞の「移動」は、血管の内側板から内膜の中へのこれらの生体内の動きを意味し、例えば、また、1つの位置から他の位置への動きをたどることによって生体外で研究することができる（例えば、時間経過のシネマトグラフィーまたはビデオカメラおよび経時的組織培養中の規定区域の中から外への平滑筋細胞の移動のマニュアルカウンティングを使用して）。

「増殖」、すなわち、平滑筋細胞または癌細胞の増殖は、すなわち、細胞の有糸分裂による、細胞数の増加を意味する。

「発現された」は、細胞によるポリペプチド、例えば、血管平滑筋細胞または血管周囲細胞により合成されたCSPGの合成、グリコシル化および／または分泌を生ずる、mRNAの転写および翻訳を意味する。

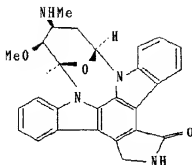
「巨大環トリコテセン」は、真菌のいくつかの種により産生されたそして12, 13-エポキシトリコテク-9-エンの基本構造により特徴づけられる、構造的に関係するセスキテルペノイドマイコキシンのグループの任意の1つ、例えば、土の真菌ミロセリシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*) およびミロセリシウム・ロ

リジウム (*Myrothecium roridum*) 中の二次代謝物の産生物であるベルカリン類およびロリジン類を意味することを意図する。

「持続放出性」は、約3～約21日間の範囲の期間の間治療剤をそれから解放するように設計された投与形態を意味する。より長い期間にわたる解放は、また、本発明の「持続放出性」投与形態として考えられる。

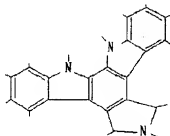
「投与形態」は、遊離の（連合する非ターゲットまたは非結合性タンパク質）治療剤配合物、ならびに持続放出性治療配合物、例えば、微小粒子またはナノ粒子、標的細胞集団にその中に分散した治療部分を放出するように1種または2種以上の結合性タンパク質またはペプチドに結合できる生物分解性または非生物分解性ポリマー物質を含むものを意味する。

「スタウロスポリン」は、スタウロスポリン、すなわち、次の式、

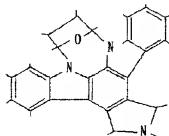


I

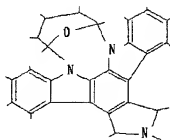
のタンパク質キナーゼCインヒビター、ばらびに次の一般構造式の1つを有するジンドロアルカロイド類を包含する：



II



III



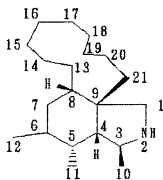
IV

さらに詳しくは、用語「スタウロsporin」は、次のものを包含する：K-252（参照、例えば、日本国特許出願第62,164,626号）、BMY-41950（米国特許第5,015,578号）、UCN-01（米国特許第4,935,415号）、TAN-999（日本国特許出願第01,149,791号）、TAN-1030A（日本国特許出願第01,246,288号）、FK-286C（日本国特許出願第02,258,724号）およびそれらの機能的同等体および誘導体。スタウロ

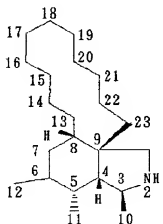
スポリンの誘導体は、次のものを包含する：日本国特許出願第03,72,485；日本国特許出願第01,143,877号、日本国特許出願第02,09,819号および日本国特許出願第03,220,194号、ならびにPCT国際特許出願No. W089 07,105号、PCT国際特許出願No. W091 09,034号および欧州特許出願No. EP410,389号および欧州特許出願No. EP296,110号に記載されているもの。K-252の誘導体、天然の産生物は既

知である。参照、例えば、日本国特許出願第63,295,988号；日本国特許出願第62,240,689号、日本国特許出願第61,268,687号、日本国特許出願第62,155,284号；日本国特許出願第62,155,285号、日本国特許出願第62,120,388号および日本国特許出願第63,295,589号、ならびにPCT国際特許出願No. W088 07,045号および欧州特許出願No. EP323,171号。

「サイトカラシン」は、標的細胞の代謝への阻害作用、例えば、血管平滑筋細胞の収縮または移動の妨害を示す真菌の代謝物を包含する。好ましくは、サイトカラシンはモノマーのアクチン（G-アクチン）の重合形態（F-アクチン）への重合を阻害し、これにより細胞質マイクロフィラメントを必要とする細胞機能を阻害する。サイトカラシンは典型的にはフェニルアラニン（サイトカラシン類）、トリプトファン（ケトグロボシン類）、またはロイシン（アスポカラシン類）から誘導され、置換されたパーヒドロイソインドール-1-オン部分の位置C-3において、それぞれ、ベンジル、インドル-3-イルメチルまたはイソブチル基を生ずる（式VまたはVI）。



V



VI

次に、パーヒドロイソインドール部分は、位置C-8およびC-9に結合した11-、13-または14-原子炭素環または酵素含有環を含有する。すべての天然に存在するサイトカラシン類は、C-5にメチル基；C-12にメチルまたはメチレン基；およびC-14またはC-16にメチル基を含有する。分子の例は次のものを包含する：サイトカラシンA、サイトラシンB、サイトカラシンD、サイトカラシンE、サイトカラシンF、サイトカラシンG、サイトラシンH、サイトカラシンJ、サイトカラシンK、サイトカラシンL、サイトカラシンM、サイトカラシンN、サイトカラシンO、サイトラシンP、サイトカラシンQ、サイトカラシンR、サイトカラシンS、ケトグロボシンA、ケトグロボシンB、ケトグロボシンD、ケトグロボシンE、ケトグロボシンF、ケトグロボシンG、ケトグロボシンJ、ケトグロボシンK、デキシホミン、プロキシホミン、プロトホミン、ザイゴスボリンD、ザイゴスボリンE、ザイゴスボリンF、ザイゴスボリンG、アスポカラシンB、アスポカラシンC、アスポカラシンDなど、ならびにそれらの機能的同等体および誘導体。ある種のサイトカラシン誘導体は、日本国特許出願第72 01 925号；日本国特許出願第72 14,219号、日本国特許出願第72 08,533号、日本国特許出願第72 23,394号；日本国特許出願第72 01924号；および日本国特許出願第72 04,164号に記載されている。

ここにおいて記載するように、平滑筋細胞および血管周囲細胞は、障害、例えば、PTCAの間に引き起こされる障害後に内膜過形成性血管部位において増殖する血管の内側板および外膜血管から誘導される細胞を包含する。

平滑筋細胞の特性は、核が存在する細胞の中の中央に長円形核が位置しそして筋形質の中に筋源繊維が位置する、紡錘体の形状の組織学的形態（光学顕微鏡の検査下で）を包含する。電子顕微鏡検査

下で、平滑筋細胞は、傍核の筋形質中の細長いミトコンドリア、顆粒状内質小網のわずかの管状要素、および遊離リボソームの多数のクラスターを有する。小さいゴルジ複合体は、また、核の1つの極付近に位置する。筋形質の大部分は細い、平行の筋フィラメントにより占有されており、これらの筋フィラメントは、大部分について、筋細胞の長軸に対して方向づけられることができる。これらのア

クチン含有筋原繊維は束で配置されており、ミトコンドリアはそれらの間に介在する。細胞の収縮物質を通して、また、卵形の密な区域が散在することができ、同様な密な区域は原形質膜の内面に沿って間隔を置いて分布する。

血管周囲細胞の特性は、不規則な細胞の形状により特徴づけられる組織学的形態（光学顕微鏡の検査下で）を包含する。血管周囲細胞は血管内皮細胞を取り囲む基底膜内に存在し、そしてそれらの同一性はアルファ平滑筋アクチン（例えば、抗アルファ-sm1, Biomakor, Rehovot, Israel）、HMW-MAA、および血管周囲細胞ガングリオシド抗原、例えば、Mab 3G5 (11) に対して特異的な抗体による陽性の免疫染色：およびサイトケラチン類（すなわち、上皮および線維芽のマーカー）およびフォン・ウィルブランド因子（すなわち、内皮マーカー）に対して抗体による陽性の免疫染色により確認することができる。血管平滑筋細胞および血管周囲細胞の両方は、NR-AN-01モノクローナル抗体による免疫染色で陽性である。

本発明の治療接合体および投与形態は、血管平滑筋細胞の活性を阻害するために、例えば、血管形成後の狭窄の減少、遅延、または排除するために有用である。ここにおいて使用するとき、用語「減少」は、動物モデルまたは人間において、血管形成後の平滑筋細胞の増殖の刺激から生ずる、内膜の厚さの増加を減少することを意味する。「遅延」は血管形成後の可視の内膜の過形成（例えば、組織

学的にあるいは血管造影検査により観察される）の開始までの時間の遅延を意味し、そして、また、再狭窄の「減少」が伴うことがある。血管形成後の再狭窄の「排除」は、外科的に干渉すること、すなわち、反復した血管形成、動脈切除、または冠状動脈バイパス手術により血管を通る適当な血流を再確立することをもはや必要としない程度に、患者における内膜過形成を、完全に「減少する」および／または完全に「遅延する」ことを意味する。狭窄を減少し、遅延するか、あるいは排除する効果は、次のものを包含するが、これらに限定されない、当業者にとって日常的な方法により決定することができる：血管造形、超音波の評価、X線透視画像形成、光学線維の内視鏡検査または生検および組織学。本発明の治療接合体は、平滑筋細胞および血管周囲細胞の細胞膜に特異的に結合することに

よって、これらの有利な効果を達成する。

本発明の治療接合体は、血管平滑筋結合性タンパク質を治療剤にカップリングすることによって得られる。治療接合体において、血管平滑筋結合性タンパク質は治療接合体を血管平滑筋細胞または血管周囲細胞にターゲティングする機能を実行し、そして治療剤は血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の細胞活性を阻害する機能を実行する。

本発明の治療投与形態（持続放出型）は、治療剤を標的細胞に持続した期間にわたって放出する能力を示す。本発明のこの面の治療投与形態は、この目的に適當な任意の形状を有することができる。好ましい持続放出性の治療投与形態は、次の特性の1または2以上を示す。

— 微小粒子（例えば、約0.5マイクロメートル～約100マイクロメートル、より好ましくは約0.5～約2マイクロメートルの直径）またはナノ粒子（例えば、約1.0ナノメートル～約1000ナノメー

トル、より好ましくは約50～約250ナノメートルの直径）、自由流動性の粉末状構造体；

— 約3～約180日、より好ましくは約10～約21日の間の期間にわたって生物分解可能に設計された生物分解性構造体、あるいは約3～約180日、より好ましくは約10～約21日の間の期間にわたって治療剤の拡散が起こるように設計された非生物分解性構造体；

— 生物適合性生物分解産物を包含する、投与形態が投与される標的組織および局所的生理学的環境と生物適合性；

— 好ましくは治療剤-ポリマーマトリックスを形成するために、その中の治療剤の安定なかつ再現性ある分散を促進し、活性な治療剤の解放は次のルートの1つまたは両方を通して起こる：（1）投与形態を通る治療剤の拡散（治療剤が投与形態を形成するポリマーまたはポリマー混合物の中に可溶性である）；あるいは（2）投与形態が生物分解するときの治療剤の解放；および

— 1または2以上の細胞および／または間質混合物のエピトープに結合する能力、約1～約10,000結合性タンパク質／ペプチド-投与形態の結合は好まし

く、そして最大約1結合性ペプチドー投与形態／PTCA表面積の150平方オングストロームはより好ましい。合計の結合数は使用する粒子大きさに依存する。結合性のタンパク質またはペプチドは、ここに記載するように粒状治療投与形態に共有結合のリガンドのサンドイッチまたは非共有結合の形式を通して粒状の治療投与形態にカップリングすることができる。

本発明の好ましい態様のナノ粒子の持続放出性治療投与形態は生物分解性であり、そして血管平滑筋細胞に結合し、そしてこのような細胞の中に主としてエンドサイトーシスにより入る。このようなナノ粒子の生物分解は、プレリソソームの小胞およびリソソームにおいて経時的に（例えば、10～21日間）起こる。本発明の好ましい

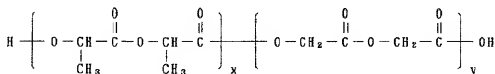
より大きい微小粒子の治療投与形態は、選択した結合性のタンパク質またはペプチドに依存して、標的細胞表面または間質マトリックスに結合し、そして引き続く細胞の吸収のために治療剤を解放し、より小さい微小粒子のわずかのみはファゴサイトーシスにより細胞の中に入る。この分野における実施者は予測するように、標的細胞が本発明の投与形態を同化および代謝する正確な機構は、これらの細胞の形態、生理学および代謝プロセスに依存する。

ターゲッテッド持続放出性治療粒状投与形態の大きさは、また、細胞の同化のモードに関して重要である。例えば、より小さいナノ粒子は間質流体とともに細胞の間を流れることができ、そして結合性タンパク質／ペプチドが標的として選択した正常または新形成組織に結合するまで、注入された組織を浸透する。この特徴は、例えば、ナノ粒子が注入された一次新形成フォーカスからのリンパ排出チャンネルをたどり、リンパ管に沿って転移性フォーカスをターゲティングするので、重要である。より大きい微小粒子は、注入された一次組織中で間質的に容易に捕捉される傾向がある。

本発明の好ましい持続放出性投与形態は、生物分解性微小粒子またはナノ粒子である。より好ましくは、生物分解性微小粒子またはナノ粒子は、不規則な、非酵素的、加水分解の切断により生物分解して治療剤を解放し、これにより粒状構造体内に孔を形成する、ポリマー含有マトリックスから形成される。

アルファヒドロキシカルボン酸および関係するラクトンの縮合から誘導されたポリマーは、本発明における使用に好ましい。とくに好ましい部分は、熱可塑性ポリエステル（例えば、ポリラクチドまたはポリグリコリド）またはラクチドおよびグリコリド成分のコポリマー、例えば、ポリ（ラクチド-コグリコリド）の混合物から形成される。例示的構造、ランダムポリ（DL-ラクチド-コグリ

コリド）を下に示し、x および y の値はこの分野における実施者により操作して所望の微小粒子またはナノ粒子の性質を達成する。



本発明の粒状投与形態を形成するために適当な他の物質は、ポリオルトエステルおよびポリアセタール (*Polymer Letters*, 18: 293, 1980) およびポリオルトカーボネート (米国特許第4,093,709号) などを包含する。

本発明の好ましい乳酸／グリコール酸のポリマーを含有するマトリックス粒子は、エマルジョンに基づく方法、すなわち、変更された溶媒抽出法を構成する方法、例えば、次の参考文献に記載されている方法により製造される::Cowsarら、

“Poly (Lactide-Co-Glycolide) Microcapsules for Controlled Release of Steroids,” *Methods Enzymology*, 112: 101-116, 1985 (微小粒子中のステロイドの捕捉) ; Eldridgeら、 “Biodegradable and Biocompatible Poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcus Enterotoxin B Toxoid Which Enhances the Level of Toxin-Neutralizing Antibodies,” *Infection and Immunity*, 59: 2978-2986, 1991 (トキシノイドの捕捉) ; Cohenら、 “Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly (Lactide/Glycolic Acid) Microspheres,” *Pharmaceutical Research*, 8 (6): 713-720, 1991 (酵素の捕捉) ; および Sandersら、 “Controlled Release of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres,” *J. Pharmaceutical Science*, 73 (9): 1294-1297, 1984 (ペブ

チドの捕捉)。

一般に、本発明の粒状投与形態を形成する方法は、ポリマーをハロゲン化炭化水素溶媒中に溶解し、治療剤溶液（好ましくは水性）をその中に分散させ、そしてハロゲン化炭化水素溶媒の溶媒であるが、ポリマーの溶媒ではない溶媒として作用する追加の物質を添加することを包含する。ポリマーはポリマー-ハロゲン化炭化水素溶液から外に治療剤含有溶液の上に沈澱し、そして治療剤を捕捉する。好ましくは、治療剤は本発明の持続放出性投与形態内に実質的に均一に分散する。粒子の形成後、それらを洗浄しそして有機溶媒で硬化させる。水の洗浄および水性非イオン性界面活性剤の洗浄工程後、室温において真空中に乾燥する。

生物適合性の目的のために、粒状投与形態は、マトリックスの形態でその中に分散した治療剤により特徴づけられ、安定化された後、包装、貯蔵または投与される。安定化は任意の普通の方法で実施することができる。例えば、粒子をガンマ線で照射することができ、ただしこのような放射線への露出は治療剤-ポリマーマトリックスまたはそれに取り付けられた結合性タンパク質/ペプチドの中に分散した治療剤の構造または機能に悪い衝撃を与えてはならない。治療剤または結合性タンパク質/ペプチドがそのように悪く衝撃される場合、粒状投与形態は無菌条件下に製造することができる。

本発明の粒状投与形態からの治療剤の解放は、拡散および粒状マトリックスの侵食の両方の結果として起こることができる。生物分解速度は治療剤解放速度に直接衝撃を与える。生物分解速度は持続放出性投与形態の組成または構造を変更することによって調節可能である。例えば、本発明の好ましい投与形態におけるラクチド/グリコリド比の変更は、例えば、次のように実施することができる、例えば、Ticeら、*Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems*," Pharmaceutical Technology, pp. 26-35, 1984に記載

されているように; Kentら、" *Microencapsulation of Water Soluble Active Polypeptides*," 米国特許第4,675,189号に記載されているように、ポリマーの加水分解変性剤、例えば、クエン酸および炭酸ナトリウムを含める; ラクチド/グ

リコリドのポリマー中の治療剤の配合を変更する、分解速度はその中に含有される治療剤の量に逆比例する、そして前記コアの配合量を変更するために異なる効能を示す治療剤の普通の族の適当な類似体の賢明な選択；およびBeckら、“Poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) /Norethisterone Microcapsules: An Injectable Biodegradable Contraceptive,” Biol. Reprod., 28:186-195, 1983に記載されているように、粒子大きさの変更など。生物分解速度を調節する前述の方法のすべてはポリマーを含有するマトリックスの極限粘度数に影響を及ぼし、これによりその水和速度を変更する。

好ましいラクチド／グリコリド構造体は哺乳動物の生理学的環境と生物適合性である。また、これらの好ましい持続放出性投与形態は、それらの生物分解が両方共哺乳動物の正常の代謝産物である乳酸およびグリコール酸を形成するという利点を有する。

粒子に結合する結合性タンパク質／ペプチドー粒状投与形態のために要求される官能基を、必要に応じて粒状構造体の中に、非分解性または生物分解性のポリマー単位と一緒に含める。この目的に利用できる官能基は、ペプチドと反応性であるもの、例えば、カルボキシル基、アミノ基、スルヒドリル基などを包含する。好ましい結合増強部分は、好ましい（ラクチドーグリコリド）ポリマーを含有するマトリックスなどの末端カルボキシル基を含む。

有用な血管平滑筋結合性タンパク質は、直ちの間質マトリックス中で治療剤を細胞外に解放し、引き続いて治療剤を残りの無傷の平滑筋細胞の中に拡散させる、および／または全体のターゲットド

生物分解性部分の細胞内の隔室の中に細胞を内在化し、治療剤の放出を可能とするような方法で、無傷のまたは崩壊した血管平滑筋細胞の表面成分上の標的またはマーカーに結合することができる、ポリペプチド、ペプチド、または模倣化合物（後述するように）である。有用な血管平滑筋結合性タンパク質の代表例は、次のものを包含する：抗体（例えば、モノクローナルおよびポリクローナルアフィニティー精製抗体、F(ab')₂, Fab', Fab、およびFv断片および／または抗体の相補性決定領域（CDR）またはそれらの機能的同等体、（例えば、結合性ペ

プチドなど)；成長因子、サイトカイン、およびポリペプチドのホルモンなど；および高分子認識細胞外マトリックスレセプター（例えば、インテグリンおよびフィブロネクチンレセプターなど）。

本発明の投与形態の態様をターゲティングするとき有用な他の好ましい結合性ペプチドは、細胞間支質および血管平滑筋細胞の間に位置するマトリックスに局在化するものを包含する。このような結合性ペプチドは、治療剤を標的細胞の間の間質空間に放出する。この型の好ましい結合性ペプチドは、コラーゲン、細胞外糖タンパク質、例えば、テナシン、小網および弾性線維および他の細胞内マトリックス物質上のエピトープに連合する。

好ましい腫瘍細胞結合性ペプチドは、myc, ras, ber/Abl, erbBなどの遺伝子産物のエピトープ、ならびにムチン、サイトカインレセプター、例えば、IL-6, EGF, TGFなどに連合し、それらの結合性ペプチドは、それぞれ、ある種のリンパ腫 (myc)、癌、例えば、結腸癌 (ras)、乳癌および肝腫瘍 (IL-6 レセプター)、および乳癌 (EGFおよびTGF) に局在化する。好ましい免疫系エフェクター細胞結合性ペプチドは抗-TAC, IL-2 などであり、これらは、それぞれ、活性化T細胞およびマクロファージに局在化する。本発明の

実施において有用な他の好ましい結合性タンパク質／ペプチドは、病理学的に増殖する正常組織、例えば、眼の退行変性疾患に関係する眼内血管系の血管周囲細胞に局在化することができる。

本発明の治療剤は、血管平滑筋細胞の細胞活性、例えば、増殖、移動、細胞体積の増加、細胞外マトリックス合成の増加（例えば、コラーゲン、プロテオグリカンなど）、あるいは細胞による細胞外マトリックス物質の分泌を阻害するように選択する。好ましくは、治療剤は次のように作用する：a) DNAの複製を阻害する（例えば、アドリマイシン、スタウロスポリンなどのような薬物）か、あるいは紡錘形線維の形成を阻害する（例えば、コルヒチンのような薬物）ことによって、増殖する細胞における細胞分割を防止または遅延するための「静細胞剤」として；あるいはb) 内側板壁から筋肉内の中への血管平滑筋細胞の移動のインヒビターとして、例えば、「抗移動剤」、例えば、サイトカラシン；あるいはは

c) 細胞体積の細胞内増加のインヒビター (すなわち、細胞により占有される組織体積; 「細胞骨格インヒビター」または「代謝インヒビター」) として; あるいは d) 細胞タンパク質の合成および/または細胞外マトリックスの分泌または構築をブロックするインヒビター (すなわち、「抗マトリックス剤」) として。

「静細胞剤」の代表例は、次のものを包含する: 例えば、変性トキシン、メトトレキセート、アドリアマイシン、放射性核種 (例えば、Frlzbergら、米国特許第4,897,255号に開示されているもの)、タンパク質キナーゼインヒビター (例えば、スタウロsporin)、特定の酵素 (例えば、核酵素DNAトポイソメラーゼIおよびDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、アデニルグアニルシクラーゼ) のインヒビター、スーパーオキシドジスムターゼのインヒビター、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、逆転写酵素、

平滑筋細胞の増殖を抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドなど、これらは細胞の隔壁の中に適当な投与量で放出されたとき、細胞を殺さないで血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の増殖を障害する作用をするであろう。「静細胞剤」の他の例は、次のものを包含する: 血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の増殖をトリガーすることができる (例えば、細胞外マトリックスの存在下に) 細胞の因子のペプチドのまたは模倣インヒビター (すなわち、拮抗物質、作用物質、または競合または非競合インヒビター): 例えば、サイトカイン (例えば、インターロイキン、例えば、IL-1)、成長因子 (例えば、PDGF、TGF-アルファまたは一ベータ、腫瘍壊死因子、平滑筋-および内皮-誘導成長因子、すなわち、エンドセリン、FGF)、ホーミングレセプター (例えば、血小板または白血球)、および細胞外マトリックスレセプター (例えば、インテグリン)。平滑筋の増殖のための静細胞剤のこのカテゴリーの中の有用な治療剤の代表例は次のものを包含する: ヘパリン、トリアゾピリミジン (Trapidil; PDGF拮抗物質)、ロバスタチンおよびプロスタグランジンE₁またはE₂のサブフラグメント。

「抗移動剤」の代表例は次のものを包含する: ケモスタクティック (chemostatic) 因子およびそれらのレセプター (補体ケモタキシン、例えば、C5a, C5a desargまたはC4a; 細胞外マトリックス因子、例えば、コラーゲン分解断片) の、

あるいは移動に関係する細胞内細胞骨格タンパク質（例えば、アクチン、細胞骨格要素、およびホスファターゼおよび移動に関係するキナーゼ）のインヒビター（すなわち、作用物質および拮抗物質、および競合または非競合インヒビター）。抗移動剤のこのカテゴリーにおいて有用な治療剤の代表例は、カフェイン酸誘導体およびニルバジピン（カルシウム拮抗物質）、およびステロイドホルモンを包含する。好ましい抗移

動剤はサイトカラシンである。

「細胞骨格インヒビター」の代表例は、細胞内で微小管およびマイクロフィラメントの網状組織に作用するコルヒチン、ビンブラスチン、サイトカラシン、タキソールなどを包含する。

「代謝インヒビター」の代表例は、スタウロスポリン、トリコテセン、および変性したジフテリアおよびリシンのトキシン、シュードモナス・エキソトキシン（*Pseudomonas exotoxin*）などを包含する。好ましい態様において、治療接合体は簡単なトリコテセンまたは巨大環トリコテセン、例えば、バルカルリンまたはロリジンである治療剤を使用して構成される。トリコテセン類は、クラスファンジ・インパーフェクチ（*Fungi imperfecti*）の上の真菌により生産されるか、あるいはバッカルス・メガポタミカ（*Baccharus megapotamica*）から単離される薬物である（Bamburg, J. R., Proc. Molec. Subcell. Biol., 8: 41-110, 1983; JarvisおよびMazzola, Acc. Chem. Res., 15: 338-395, 1982）。それらは、炭素、水素および酸素のみを含有する最も毒性の分子であるように思われる（Tamm, C., Fortschr. Chem. Org. Naturst., 31: 61-117, 1974）。それらは、開始、伸び、または末端の期におけるタンパク質合成のインヒビターとしてリボソームのレベルで作用するとすべて報告されている。

トリコテセン類の2つの広いクラスが存在する：中央のセスキテルペノイド構造のみを有するものおよび追加の巨大環を有するもの（それぞれ、簡単なおよび巨大環のトリコテセン）。簡単なトリコテセン類は、米国特許第4,744,981号および米国特許第4,906,452号（ここに引用によって加える）に記載されているように、3つのグループ（すなわち、グループA、B、およびC）に細分割するこ

とができる。グループAの簡単なトリコテセン類の代表例は次のも

のを包含する：スキルペン、ロリジンC、ジヒドロトリコテセン、スキルペン-4, 8-ジオール、ベルルカロール、スキルペントリオール、T-2テトラオール、ペンタヒドロキシスキルペン、4-デアセチルネオソラニオール、トリコデルミン、デアセチルチルカロネクトリン、カロネクトリン、ジアセチルベルカロール、4-モノアセトキシスキルペノール、4, 15-ジアセトキシスキルペノール、7-ヒドロキシジアセトキシスキルペノール、8-ヒドロキシジアセトキシスルキペノール（ネオソラニオール）、7, 8-ジヒドロキシジアセトキシスキルペノール、7-ヒドロキシ-8-アセチルジアセトキシスキルペノール、8-アセチルネオソラニオール、NT-1, NT-2, HT-2, T-2、およびアセチルT-2トキシシ。

グループBの簡単なトリコテセン類の代表例は次のものを包含する：トリコテコロン、トリコテシン、デオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、5-アセチルデオキシニバレノール、3, 15-ジアセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、4-アセチルニバレノール（フサレノン-X）、4, 15-ジアセチルニバレノール、4, 7, 15-トリアセチルニバレノール、およびテトラアセチルニバレノール。グループCの簡単なトリコテセン類の代表例は、クロトロールおよびクロトシンを包含する。代表的な巨大環トリコテセンは次のものを包含する：ベルカリンA、ベルカリンB、ベルカリンJ（サトラトキシシC）、ロリジンA、ロリジンD、ロリジンE（サトラトキシシD）、ロリジンH、サトラトキシシF、サトラトキシシG、サトラトキシシH、ベルチスポリン、ミトキシシA、ミトキシシC、ミトキシシB、ミロトキシシA、ミロトキシシB、ミロトキシシC、ミロトキシシD、ロリトキシシA、ロリトキシシB、およびロリトキシシD。さらに、一般的「トリ

36

コテセン」セスキテルペノイドの環構造は、また、高等植物バツカルス・メガボタミカ (*Baccharis megapotamica*) から単離された用語「バツカルン類」化合物の中に存在し、そしてこれらは文献、例えば、Chemistry of Alleopathy, ACS S

ymposium Series No. 268; A. C. Thompson編、1984, pp. 149-159)に記載されている。

「抗マトリックス剤」の代表例は、マトリックスの合成、分泌および集合、構築の架橋（例えば、トランスグルタミナーゼの架橋コラーゲン）、およびマトリックスの改造作用（例えば、創傷治癒後）のインヒビター（すなわち、作用物質および拮抗物質および競合および非競合インヒビター）を包含する。抗マトリックス剤のこのカテゴリーにおける有用な治療剤の代表例は、コルヒチン、細胞外マトリックスの分泌のインヒビターである。

本発明の持続放出性投与形態の態様のために、治療剤は好ましくは細胞を殺さないで血管平滑筋細胞活性を阻害するもの（すなわち、静細胞性治療剤）である。この目的に好ましい治療剤は、次の能力の1または2以上を示す：タンパク質合成の阻害前にDNA合成を阻害することあるいは筋肉内の中への血管平滑筋細胞の移動を阻害することである。これらの治療剤はタンパク質合成を有意に阻害せず（すなわち、標的細胞を殺さない）、したがって、平滑筋細胞の増殖を減少することによって、細胞の修復およびマトリックスの産生を促進して、血管形成により引き起こされる血管壁の病変を安定化する。

このような好ましい治療剤の例は、タンパク質キナーゼインヒビター、例えば、スタウロスポリン（スタウロスポリンはシグマ・ケミカル・カンパニー（Sigma Chemical Co.）、ミズリー州セントルイスから入手可能である）、サイトカラシン類、例えば、サイトカラシンB（シグマ・ケミカル・カンパニー）、およびスラミン（FBA

ファーマシューティカル（Pharmaceuticals）、コネクチカット州ウェストヘブン）、ならびにニトログリセリン（デュポン・ファーマシューティカル・インコーポレーテッド（DuPont Pharmaceuticals, Inc.）、プエリトリコ、マヌチ）またはそれらの類似体または機能的同等体である。これらの化合物は静細胞性であり、そして有意なDNA合成の阻害が起こる場合の濃度において最小のタンパク質合成の阻害および細胞障害性を発揮することが示された（参照、実施例8および第10A図～第10D図）。本発明の持続放出性投与形態の態様において有用な治療

剤を同定するために有用なプロトコルは、例えば、実施例8に記載されている。この分野における実施者は、異なる標的細胞の集団、例えば、付着性単層標的細胞の型のためにこのような同定を行うための、実質的に同等の実験のプロトコルを設計することができる。

本発明の他の態様は、癌細胞に対して細胞障害性である物質を包含する。これらの態様のために好ましい物質は、ロリジンA、シュードモナス・エキソトキシン (*Pseudomonas exotoxin*) などまたはそれらの類似体または機能的同等体である。放射性同位元素などを包含する、このような治療剤の体液過剰は同定され、そしてこの分野において知られている。さらに、細胞障害性部分の同定のためのプロトコルは既知であり、そしてこの分野において日常的に使用される。

免疫系仲介疾患のエフェクター細胞の変調は、また、本発明の持続放出性投与形態を使用して達成することができる。このような変調は、局所的持続放出性投与形態の投与によりアクセス可能であるエフェクター細胞の集団を有する疾患に関して、好ましくは実施される。関節炎（関節内投与）、スプルー（経口投与）、ブドウ膜炎および眼内炎（眼内投与）および角膜炎（結膜下投与）の処置にお

いてリンパ細胞網細胞に対して要求される変調活性、例えば、細胞致死性、静細胞性、代謝変調などの活性を有する治療部分は、この分野において知られている技術を使用して同定可能である。これらの物質は、また、多数の障害を生ずる上皮腺および内分泌器官の機能亢進を減少するために使用することができる。これらの態様のために好ましい物質は、ロリジンA、シュードモナス・エキソトキシン (*Pseudomonas exotoxin*)、スラミン、タンパク質キナーゼインヒビター（例えば、スタウロスポリン）など、またはそれらの類似体または機能的同等体を包含する。

本発明の実施において有用な他の好ましい治療剤は、正常組織の病理学的増殖、移動または機能亢進を減少または排除することができる部分を包含する。このような治療剤の例は、角膜内皮およびストロマの機能亢進、過形成または血管管腔区域の減少から生ずる眼の退行変性疾患に関係する眼内血管系および血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の病理学的増殖または延長した収縮を減少または排除する

ことができるものである。この目的に好ましい物質はスタウロsporinおよびサイトカラシンBである。

本発明の血管平滑筋結合性タンパク質は、血管平滑筋細胞の表面上の標的に結合する。認識されるように、血管平滑筋細胞の細胞膜に連合する特定の標的、例えば、ポリペプチドまたは炭水化物、プロテオグリカンなどは、特定の血管平滑筋結合性タンパク質を適当に選択（例えば、クローニングにより）または構成（例えば、遺伝子操作または化学的合成により）するために有用である。とくに有用な「標的」は、平滑筋細胞により内在化され、例えば、このとき膜成分の抗原のターンオーバーが更新において起こる。細胞により内在化は、また、ファゴリソソーム、クラトリン被覆穴、レセプター仲介再分布またはエンドサイトーシスなどを包含する機構による

ことができる。好ましい態様において、このような「標的」の例は、血管平滑筋細胞および血管周囲細胞により合成されるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）であり、そして約250kDの見掛けの分子量を有するCSPG分子の離散部分（ここにおいてエピトープと呼ぶ）はことに好ましい。250kDの標的は、より大きい400kDのプロテオグリカン複合体の成分である（14）。1つの現在好ましい態様において、血管平滑筋結合性タンパク質は、血管平滑筋CSPG標的分子中のエピトープに結合するNR-AN-01モノクローナル抗体により提供される。NR-ML-05と表示するモノクローナル抗体は、黒色腫細胞により合成された250kDのCSPGに結合すると報告されている（Morganら、米国特許第4,897,255号）。平滑筋細胞および血管周囲細胞は、また、250kDのCSPGならびに他のCSPGを合成すると報告されている（11）。平滑筋細胞に結合するNR-ML-05は開示された（Fritzbergら、米国特許第4,879,225号）。モノクローナル抗体NR-ML-05および継代培養NR-ML-05 No. 85-41-41-A2, freeze #A2106は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）米国マリイランド州ロックビレに受託されそして、それぞれ、受け入れ番号HB-5350およびHB-9350を許された。NR-ML-05は、ここに開示するサブクローンNR-AN-01の親であり、そして構造的かつ機能的にそれと同等である。認識されるように、NR-AN

—01は、400kDのCSPG標的に特異的に連合する血管平滑筋結合性タンパク質のちょうど1つの例であり、そしてこの標的に連合する他の結合性タンパク質およびこの標的中の他のエピトープ(14)は、また、本発明の治療接合体および方法において有用である。この場合において、6つの他のネズミモノクローナル抗体および2つのヒトキメラモノクローナル抗体を、また、選択し、これらは血管平滑筋細胞の250kDのCSPGに特異的にターゲット

ッティングする。抗体は、また、細胞膜への結合後に平滑筋細胞により内在化されるように思われる。免疫反応性の研究は、また、45のヒト正常組織および30の異なる新生物における250kDの抗原へのネズミMAbの結合を示し、そしてこれらの結果のいくつかは従来開示された(米国特許第4,979,225号)。この開示および他のヒト臨床的研究において、CSPGの250kDのの抗原に対して向けられたMAbは生体内で血管平滑筋細胞に局在化した。さらに、認識されるように、CSPGマーカー抗原性エピトープとのNR-AN-01モノクローナル抗体の多点速度論の連合に関係するアミノ酸残基(すなわち、相補性決定領域を構成するアミノ酸)は、コンピューター補助の分子のモデリングによりおよび抗体結合親和性を変更した突然変異体の使用により決定される。結合部位のアミノ酸およびNR-AN-01抗原結合部位の3次元のモデルは、血管平滑筋細胞および血管周囲細胞により系されたCSPGについての結合親和性を有する、機能的同等体、例えば、短いポリペプチド(「小さいポリペプチド」)を構成するための分子モデルとして働く。

血管の外科的処置後に狭窄を処置する現在好ましい態様において、本発明の実施において使用するための、例えば、PTCA、選択した結合性タンパク質、例えば、抗体または断片は血管平滑筋の250kDのCSPGについての $>10^4$ リットル/モルの結合親和性を有し、そして、また、血管平滑筋細胞または血管周囲細胞に結合しそしてそれらにより内在化される能力を有する。

3次元のモデリングは、また、NR-AN-01のその抗原性エピトープへの結合を模倣する他の機能的同等体、例えば、CSPG標的抗原においてNR-AN-01そのエピトープへの結合の3次元の面を模倣する「模倣性」化合物を構成するために有用である。ここにおいて使用するとき、「模倣性ポリペプチド」は少なくとも6ア

ミノ酸の長

さのアミノ酸配列を意味する。ここにおいて使用するとき、用語「模倣性」は血管平滑筋細胞または血管周囲細胞により合成される、例えば、NR-AN-01のCSPG標的のアミノ酸への結合のために適切な間隔を達成するために構成された、有機化学のポリマーを意味する。

認識されるように、本発明者らは、また、本発明の治療接合体における血管平滑筋結合性タンパク質としてヒトモノクローナル抗体または「ヒト化」ネズミ抗体の利用を考える。例えば、ネズミモノクローナル抗体は、ネズミFv領域（すなわち、抗原結合部位を含有する）をエンコードするヌクレオチド配列をヒト一定ドメイン領域およびFc領域をエンコードするヌクレオチド配列で、例えば、欧州特許出願第0,411,893 A2号に開示されている方法に類似する方法で、遺伝子組み換えすることによって「キメラ化」することができる。ヒト化血管平滑筋結合性タンパク質は宿主受容体における抗体またはポリペプチドの免疫反応性を減少するという利点を有し、これはこれにより生体内の半減期を増加しそして悪い免疫反応の可能性を減少するために有用であろうことが認識されるであろう。

また、再狭窄の処置のために有用な結合性ペプチドとして考えられる本発明の持続放出性投与形態は、血管平滑筋細胞の間に位置細胞間支質およびマトリックスに局在化するものである。このような結合性ペプチドは治療剤を標的細胞の間の間質空間に放出する。治療剤は、血管平滑筋細胞により引き続き吸収のために、このような間質空間の中に解放される。この型の好ましい結合性ペプチドは、コラーゲン、細胞外糖タンパク質、例えば、テナシン、小網および弾性繊維、サイトケラチンおよび他の細胞間ミトコンドリア成分上のエピトープに連合する。細胞内支質およびマトリックスに局在化する最小ペプチド、模倣性有機化合物、ヒトまたはヒト化モノクロー

ナル抗体などは、また、本発明のこの態様において結合性ペプチドとして有用である。このような結合性ペプチドは、既知の技術に従い、同定しそして構成するか、あるいは単離することができる。本発明の好ましい態様において、間質マ

トリックスの結合性タンパク質は、少なくとも約 10^{-4} Mの連合定数で標的エピトープに結合する。

本発明の癌処置の態様に有用な結合性ペプチドは、癌細胞などの細胞膜および細胞質のエピトープに連合するものである。この結合性タンパク質は、それぞれ、無傷の細胞の表面膜および崩壊した細胞の内部のエピトープに局在化し、そして標的細胞の中への同化のために治療剤を放出する。要求される腫瘍細胞の型に局在化する最小ペプチド、模倣性有機化合物およびヒトまたはヒト化抗体は、また、本発明の結合性ペプチドとして有用である。このような結合性ペプチドは、既知の技術に従い、同定しそして構成するか、あるいは単離することができる。本発明のこれらの態様の好ましい結合性ペプチドは、少なくとも約 10^{-6} Mの連合定数で標的エピトープに結合する。

免疫系仲介疾患のエフェクター細胞、例えば、リンパ細胞系の細胞に局在化する膜および細胞質のエピトープに対して結合性ペプチドは、また、本発明の持続放出性投与形態を放出するために有用である。治療剤はこのような持続放出性投与形態によりその中への内在化のために標的細胞に放出される。要求されるエフェクター細胞の型に局在化する最小ペプチド、模倣性有機化合物およびヒトまたはヒト化抗体は、また、本発明の結合性ペプチドとして有用である。このような結合性ペプチドは、既知の技術に従い、同定しそして構成するか、あるいは単離することができる。本発明のこれらの態様の好ましい結合性ペプチドは、少なくとも約 10^{-6} Mの連合定数

で標的エピトープに結合する。

本発明の実施において有用な他の好ましい結合性タンパク質またはペプチドは、病理学的に増殖する正常組織、例えば、眼の退行変性疾患に関係する眼内血管系の血管周囲細胞に局在化することができる部分を包含する。治療剤はこのような持続放出性投与形態によりその中への内在化のために標的細胞に放出される。要求される病理学的に増殖する正常細胞の型に局在化する最小ペプチド、模倣性有機化合物およびヒトまたはヒト化抗体は、また、本発明の結合性ペプチドとして有用である。このような結合性ペプチドは、既知の技術に従い、同定しそして

構成するか、あるいは単離することができる。本発明のこれらの態様の好ましい結合性ペプチドは、少なくとも約 10^{-6} Mの連合定数で標的エピトープに結合する。

共有結合または非共有結合を通して血管平滑筋結合性タンパク質に治療剤を連鎖させる代表的な「カップリング」法は化学的交差リンカーおよびヘテロ二官能架橋化合物（すなわち、「リンカー」）を包含し、これらのリンカーは血管平滑筋結合性タンパク質中で反応して反応性基（例えば、ヒドロキシル、アミノ、アミド、またはスルフヒドリル基）の間で結合を形成する。この結合は、例えば、ペプチド結合、ジサルファイド結合、チオエステル結合、アミド結合、チオエーテル結合などであることができる。1つの例示的例において、モノクローナル抗体と薬物との接合体はMorganおよびFoon (Monoclonal Antibody Therapy to Cancer: Preclinical Models and Investigations, Basic and Clinical Tumor Immunology, Vol. 2, Kluwer Academic Publishers、マサチューセッツ州ヒンガム) およびUhr (J. of Immunol., 133: i-vii, 1984) により要約された。接合体が放射性核種の静細胞剤を含有する、他の例示的例において、米国特許第4,897,255号、Fritzbergら（ここに引用によ

て加える）は有用でありうるカップリング法の教示である。1つ現在好ましい態様において、治療接合体はトリコテセン薬物に共有結合出カップリングした血管平滑筋結合性タンパク質を含有する。この場合において、連鎖の共有結合は、血管平滑筋結合性タンパク質の1または2以上のアミノ、スルフヒドリル、またはカルボキシル基と、a) トリコテセンそれ自体；b) トリコテセンヘミスクシネートカルボン酸；c) トリコテセンヘミスクシネート (HS) N-ヒドロキシスクシンイミデートエステル；またはd) ポリ-L-リジンまたは任意のポリマーの担体とのトリコテセン複合体との間で形成することができる。トリコテセン治療剤を含有する治療接合体を製造するカップリング法の代表例は、米国特許第4,906,452号および米国特許第4,744,981号（ここに引用によって加える）に記載されている。結合性タンパク質とトリコテセンとの間でシッフ塩基の連鎖を形成するためにヒドラジドを使用する1つの例は、係属中の米国特許出願第07/415,154

号（ここに引用によって加える）に開示されている。

カップリング法の選択は、血管平滑筋結合性タンパク質またはペプチド、間質マトリックスの結合性タンパク質またはペプチドおよび治療剤の選択により、およびまた、例えば、貯蔵寿命の安定性のような物理的性質により、および／または、例えば、細胞および血液中の半減期、細胞内隔室化ルートなどにより影響を受けるであろう。例えば、1つの現在好ましい治療接合体において、ロリジンA治療剤のヘミスクシネート接合体はペルルカリンAのそれらより長い血清半減期を有し、そしてこの増加した安定性は有意に増加した生物学的活性を生ずる。

本発明の持続放出性の態様は、非生物分解性または生物分解性のポリマー構造体内に分散した治療剤を含む。このような分散は次の

文献に記載されている手順に従い実施される：Cowsarら、“Poly (Lactide-Co-Glycolide) Microcapsules for Controlled Release of Steroids,” Methods Enzymology, 112: 101-116, 1985; Eldridgeら、“Biodegradable and Biocompatible Poly (DL-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcal Enterotoxin B Toxoid Which Enhances the Level of Toxin-Neutralizing Antibodies,” Infection and Immunity, 59: 2978-2986, 1991; Cohenら、“Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly (Lactide/Glycolic Acid) Microspheres,” Pharmaceutical Research, 8 (6): 713-720, 1991; および Sandersら、“Controlled Release of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly (D, L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres,” J. Pharmaceutical Science, 73 (9): 1294-1297, 1984.

本発明の持続放出性投与形態の物理的および化学的特性は、結合性タンパク質またはペプチドへの取り付けのいくつかの別のモードに付することが可能である。本発明の投与形態（持続放出型）は、例えば、共有結合、直ちのリガンドサンドイッチ取り付け、または非共有結合の吸着または部分的捕捉を通して結合性タンパク質／ペプチドに結合することができる。好ましいポリラクチド／グリコール酸粒子をその中に治療剤を分散させて形成するとき、未帯電のポリマー主鎖は内方に（その中に擬親油性治療剤が含有される）および外方に末端のカルボキシ

基の大部分に沿って配向されている。これらの表面のカルボキシ基は、結合性タンパク質／ペプチドの親核基のために、例えば、カーボジイミドで活性化したとき、共有結合の取り付け部位として働くことができる。このような親核基は、リジンエプシロンアミノ基（アミド連鎖）、セリンヒドロキシル基（エステル連鎖）またはシステインメルカプタン基（チオエステル連

鎖）を包含する。特定の基との反応は、pHおよび反応条件の還元性状態に依存する。

例えば、末端カブロン酸基を有するポリ－乳酸／グリコール酸の粒子をN-加水分解ベンゾトリアゾールと、式 $R-N=C=N-R'$ （ここでRは3-ジメチルアミノプロピル基などでありそしてR'はエチルなどである）の水溶性カーボジイミドの存在下に反応させる。次いでベンゾトリアゾール誘導体粒子（すなわち、活性化イミデートを有する部分）をタンパク質／ペプチド親核部分、例えば、有効なエプシロンアミノ部分と反応させる。あるいは、p-ニトロフェノール、テトラフルオロフェノール、N-ヒドロキシスクシンイミドなどの分子は、カーボジイミドの存在下にポリ－乳酸／グリコール酸の粒子の末端カルボキシ基をもつ活性エステルを形成するために有用である。他の結合性タンパク質／ペプチドの親核部分は、セリンのヒドロキシル基、システインの内因性遊離チオールを包含し、チオール基は結合性タンパク質／ペプチドのジサルファイド架橋の還元からその目的に普通の使用される還元剤（例えば、システイン、ジチオスレイトール、メルカプトエタノールなど）などを使用して生ずる。さらに、ポリ－乳酸／グリコール酸の粒子を塩化チオニルとの反応により活性化して塩化アシル誘導体部分を形成することができる。次いで、誘導体された粒子を結合性タンパク質／ペプチドの親核基と反応させて、本発明のターゲット投与形態を形成する。

直接の持続放出性投与形態－結合性タンパク質またはペプチドの接合は、結合性タンパク質／ペプチドの標的細胞の認識を混乱することがある。リガンドサンドイッチ取り付け技術は、持続放出性投与形態－結合性タンパク質／ペプチドの取り付けを達成するために有用な別法である。このような技術は、標的細胞の集団に結合しな

いタンパク質を使用して一次ペプチドまたはタンパク質の外殻を形成することを包含する。次いで結合性タンパク質／ペプチドを一次ペプチドまたはタンパク質の外殻に結合させて、機能的結合性タンパク質／ペプチドをもつ生ずる粒子を形成する。リガンドサンドイッチのアプローチの例は、アビジンまたはストレプトアビジンを粒子に、「直接」結合のアプローチに関して前述したように官能基を通して共有結合で取り付けることを包含する。結合性タンパク質またはペプチドを、好ましくは、官能化ビオチンで誘導する（例えば、活性エステル、ヒドラジド、ヨードアセタール、マレイミジルなどの官能基を通して）。アビジン／ストレプトアビジンの一次タンパク質外殻の有効なビオチン結合部位へのリガンド（すなわち、結合性ペプチドまたはタンパク質／官能化ビオチン）の取り付けは、飽和量のビオチニル化タンパク質／ペプチドを使用して起こる。

例えば、末端カルボキシル基をもつポリ－乳酸／グリコール酸の粒子をカーボジイミドで活性化し、そして引き続いてアビジンまたはストレプトアビジンと反応させる。結合性タンパク質またはペプチドをビオチンアミドカプロエートN－ヒドロキシスクシンイミドエステルと1～3モルのビオチン含有化合物／結合性タンパク質／ペプチドにおいて反応させて、ビオチニル化結合性タンパク質／ペプチドを形成する。モル過剰のビオチニル化結合性タンパク質／ペプチドをアビジン誘導粒子とインキュベーションして、本発明のターゲット投与形態を形成する。

あるいは、粒子のカルボキシ基をビオチニル化する（例えば、カルボキシ基のカーボジイミドの活性化および引き続きアミノアルキルビオチンアミドとの反応により）。次いでビオチニル化粒子を飽和濃度（すなわち、モル過剰）のアビジンまたはストレプトアビジンとインキュベーションして、遊離ビオチン結合部位を有するタン

パク質被覆粒子を形成する。次いでこのような被覆された粒子は、前述したように形成されたビオチニル化結合性タンパク質のモル過剰と反応することができる。他のオプションは、ビオチニル化粒子へのアビジンまたはストレプトアビジン結合結合性タンパク質またはペプチドの取り付けを包含する。

さらに、結合性タンパク質／ペプチド粒子の取り付けは、粒子の部分的に露出したポリマーの主鎖の非イオン性特性から生ずる、結合性タンパク質の粒子への吸着により達成することができる。高いイオン強度の条件（例えば、1.0モルのNaCl）下に、水素および疎水性粒子－結合性タンパク質／ペプチドの結合は促進される。

そのうえ、結合性タンパク質／ペプチドは粒子のポリマーのマトリックスの中にそれが形成するときに部分的に捕捉されることができる。これらの環境下に、このような捕捉された結合性タンパク質／ペプチドは残留選択的結合特性を粒子に与える。適度の粒子形成条件、例えば、Cohenら、Pharmaceutical Research, 8:713-720 (1991) において使用されている条件は、本発明のこの態様のために好ましい。このような捕捉された結合性タンパク質は、また、エンドサイトーシスを行った、部分的に分解した粒子の標的細胞の取り付けにおいて有用である。異なる露出された官能基を有する他のポリマーの粒子の投与形態（例えば、非生物分解性の投与形態）は、前述の原理に従い結合性タンパク質またはペプチドに結合させることができる。

本発明の実施において有用な非生物分解性ポリマーの例は、ポリスチレン、ポリプロピレン、スチレンアクリルコポリマーなどである。このような非生物分解性ポリマーは、結合性タンパク質／ペプチドの取り付けのための官能基、例えば、カルボン酸基、脂肪族第1アミノ基、芳香族アミノ基およびヒドロキシル基を有するか、あ

るいはそれらを有するように誘導することができる。

カルボン酸の官能基は、例えば、ポリ－乳酸／グリコール酸の生物分解性ポリマー粒子の投与形態について前述した反応機構を使用して、結合性タンパク質またはペプチドにカップリングさせる。第1アミノ官能基は、例えば、それとコハク酸無水物との反応によりカップリングして、前述したように結合性タンパク質／ペプチドに結合させることができる末端カルボキシ部分を形成する。さらに、第1アミノ基は臭化シアンで活性化し、そして結合性タンパク質／ペプチドの第1アミノ基とグアニジン連鎖を形成することができる。芳香族アミノ官能基は、

例えば、亜硝酸でジアゾ化して、結合性タンパク質／ペプチドのチロシンと反応するジアゾニウム部分を形成し、これにより非生物分解性粒子と結合性タンパク質／ペプチドとの間にジアゾ結合を生成する。ヒドロキシル官能基を結合性タンパク質／ペプチドの第1アミノ基に、例えば、ヒドロキシル部分を末端カルボキ酸官能基に変換することによって、カップリングさせる。このような変換はクロロ酢酸との反応および引き続きカーボジイミドとの反応により達成することができる。生物分解性粒子に関して前述した、サンドイッチ、吸着および捕捉の技術は、非生物分解性粒子－結合性タンパク質／ペプチドの結合に同様な適用可能である。

好ましい態様において、ターゲッティングは、外傷を受けた血管部位の内膜領域における平滑筋の増加を生ずる潜在的に増殖する細胞、例えば、血管形成後の、例えば、血管周囲細胞および血管平滑筋細胞に対して特異的である。本発明の面は、本発明を治療接合体を使用して、血管形成、例えば、粒子、動脈切除および経皮的経管腔的冠状回転アセロブレイション (atheroblation) 後の平滑筋の増殖を遅延、減少、または排除するために使用される。

他の好ましい態様において、ターゲッティングは、局所的投与に対してアクセス可能な一次または転移性腫瘍フォーカス、例えば、開腹により浸潤のための露出されるか、あるいはX線透視検査のために可視とされた一次または転移性腫瘍のフォーカスに対して特異的であるか、あるいは哺乳動物内の小さい区域または腔に制限された内部の腫瘍のフォーカスまたは腫瘍、例えば、腹の中に位置する卵巣癌、フォーカスまたは多フォーカスの腫瘍などへのコンピューター化局所解剖の誘導および注入の針の投与である。本発明のこの態様の面は、治療剤が標的細胞に対して細胞障害性であるか、あるいは細胞を代謝的に変調して、化学療法および／または放射線治療に対する細胞を感受性を増加する、治療条件を包含する。

他の態様において、ターゲッティングは免疫系仲介疾患、例えば、関節炎、眼内の免疫系仲介疾患またはスプルーに關係する局所的投与のアクセス可能なエフェクター細胞の集団に対して特異的である。本発明のこの態様の面は、治療剤が

標的細胞に対して細胞障害性であるか、あるいは標的細胞の生物学的応答を変更して治療の目的を達成する、治療条件を包含する。

他の態様において、ターゲティングは局所的投与がアクセス可能な、例えば、眼の退行変性疾患、角膜パンプス、活動過剰内分泌腺などに関係する、病理学的に増殖するか、あるいは活動過剰の正常細胞の集団に対して特異的である。本発明のこの態様の面は、治療剤が標的細胞の集団の増殖または活動過剰を減少または排除する、治療条件を包含する。

外傷を受けたまたは疾患のある血管部位の処置のために、本発明の治療接合体または投与形態は宿主に注入カテーテル、例えば、C. R. Bard Inc.、マサチューセッツ州ビレリカにより製造されたもの、あるいはWolinsky (7; 米国特許第4, 824, 436号) またはSpears

(米国特許第4, 512, 762号) により開示されているものを使用して投与することができる。この場合において、治療接合体の治療的に有効な投与量は、カテーテルのバルーンの間の流体空間中の接合体の濃度が約 10^{-3} ~ 10^{-12} Mの範囲にあるとき、典型的には到達される。ここに提供された実施例から認識されるように、本発明の治療接合体は管腔をライニングする内膜または膜媒質の細胞の基部の(6~9)細胞層を抗増殖治療接合体に対して暴露するために十分な抗増殖治療投与量で放出されることが必要であるが、これに対して抗収縮治療投与量は膜媒質全体を暴露することが必要であり、そしてさらにこの投与量は実験的に、例えば、a) 適当な動物モデルの系からの血管を注入しそして免疫組織化学的方法を使用して接合体およびその作用を検出する(例えば、下の実施例において例示されているように); そしてb) 適当な生体外の研究、例えば、下の実施例3、4、および5において例示されている研究を実施することによって決定することができる。

代表例において、この治療的に有効な投与量は10mlの200 μ g/mlの治療接合体の溶液を調製することによって達成され、ここで血管平滑筋結合性タンパク質はNR-AN-01でありそして治療剤はロリジンA、トリコセシム薬物である。血管外傷、例えば、手術または疾患から生ずる外傷(例えば、下を参照)を処置する

ために、治療接合体を注入カテーテルで投与するとき、10mlは普通にカテーテルを充填しかつ1～1.5mlを血管壁の中の1～3つの外傷損傷部位の中に注入するために十分であろう。当業者は認識するように、本発明による治療接合体の所望の治療的に有効な投与量はいくつかの因子、例えば、a) 治療接合体中の血管平滑筋結合性タンパク質の結合親和性；b) 注入の間に加えられる大気圧；c) 投与された治療接合体が血管部位に存在する時間経過；d) 使用する治療剤の特質

；および／またはe) 血管の外傷の特質および所望の治療に依存するであろう。治療的に有効な投与量で薬物を放出するように訓練された当業者（例えば、薬物のレベルを監視しそして患者における臨床的效果を観察することによって）は、経験および専門的判断に基づいて個々の患者のために最適な投与量を決定するであろう。好ましい態様において、約0.3気圧（すなわち、300mmHg）～約3気圧の圧力を血管壁に15秒～3分間直接加えることは、NR-AN-01結合性タンパク質を含有する治療接合体を哺乳動物の動脈壁の平滑筋層の中に浸潤させるために適切である。当業者は認識するように、疾患のあるヒト血管壁の内膜層の中への治療接合体の浸潤は多分変動し、そして個々の基準で決定することが必要であろう。

本発明の態様の持続放出性投与形態は、管腔をライニングする膜媒質の平滑筋細胞の基部の（6～9）細胞層を投与形態に対して暴露するために十分な抗増殖治療投与量で放出されることがのみが必要である。この投与量は実験的に、例えば、a) 適当な動物モデルの系からの血管を注入しそして免疫組織化学的、X線透視検査または電子顕微鏡検査の方法を使用して投与形態およびその作用を検出する；そしてb) 適当な生体外の研究を実施することによって決定することができる。

代表例において、この治療的に有効な投与量は、連続的暴露において、毒性および最小有効投与量の間で治療効果を生ずる、血管周囲細胞剤の投与量を平滑筋細胞組織培養において決定することによって達成される。この治療レベルは、血管周囲細胞の治療投与量を維持するために動脈壁の平滑筋細胞の間に注入される粒子のために要求される治療剤の大きさ、数および濃度および解放速度を決定することによって、生体内で得られる。投与形態は、次の例示的治療剤の血管周囲

細胞の投与量に近似する速度で治療剤を解放すべきで

ある：約0.01～約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のニトログリセリン、約1.0～約1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のスラミン、約0.001～約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサイトカラシン、および約0.01～約10⁵ ng/ml のスタウロスポリン。

当業者は認識するように、本発明の持続放出性投与形態の所望の治療的に有効な投与量はいくつかの因子、例えば、a) 投与形態に関連する結合性タンパク質の結合親和性；b) 大気圧および注入の期間；c) 投与された投与形態が標的部位に存在する時間経過；d) 粒状投与形態からの治療剤の解放速度；e) 使用する治療剤の特質；f) 外傷の特質および所望の治療；および／またはg) 粒状投与形態の細胞間および／または細胞内の位置に依存するであろう。治療的に有効な投与量で薬物を放出するように訓練された当業者（例えば、治療剤のレベルを監視しそして患者における臨床的效果を観察することによって）は、経験および専門的判断に基づいて個々の患者のために最適な投与量を決定するであろう。好ましい態様において、約0.3気圧（すなわち、300mmHg）～約3気圧の圧力を血管壁に15秒～3分間直接加えることは、NR-AN-01結合性タンパク質に結合した持続放出性投与形態を哺乳動物の動脈壁の平滑筋層の中に浸潤させるために適切である。Wolinskyら、“Direct Intrarterial Wall Injection of Microparticles Via a Catheter: A potential Drug Delivery Strategy Following Angioplasty,” Am. Heart Jour., 122 (4) : 1136-1140, 1991。当業者は認識するように、標的細胞の集団の中への持続放出性投与形態の浸潤は多分変動し、そして個々の基準で決定することが必要であろう。

また、認識されるように、その作用を細胞内的に、例えば、リボソームまたはDNA代謝に発揮する治療剤の選択は、投与量および治療的に有効な投与量を達成するために要求される時間に影響を及ぼすであろう、そしてこのプロセスは生体外および動物の研究、例

えば、下に提供された実施例に開示されているものにおいてモデリングして、血管形成後の再狭窄を遅延、減少または防止するというその作用を達成するために

治療接合体または投与形態を投与すべき濃度の範囲を見出すことができる。例えば、既知の比活性のアルファ、ベータまたはガンマ放射体（例えば、ミリキュリー／ミリモルまたはミリグラムのタンパク質）で放射線標識化した治療接合体は、治療的に有効な投与量を決定するために有用であり、ここでそれらを動物の研究およびヒトの実験において使用して、組織学的組織の断面の定量的画像形成またはオートラジオグラフィーにより治療プロトコルにより要求される治療接合体の濃度を決定する。治療接合体または投与形態の治療的に有効な投与量は、少なくとも3つの条件を満足するとき、到達されるであろう；すなわち、

（1）治療接合体または投与形態は外傷的に障害された血管の内膜層の中に分布される；（2）治療接合体または投与形態は平滑筋細胞の所望の細胞内の隔壁、すなわち、治療剤の活性のために必要な隔壁の中に分布されるか、あるいは投与形態から細胞外に解放された治療剤は関係する細胞内の隔壁の中に分布される；および（3）治療剤は血管平滑筋細胞の所望の細胞活性、例えば、前述の増殖、移動、細胞体積の増加、マトリックスの合成、細胞の収縮などを阻害する。

認識されるように、治療接合体または投与形態を注入カテーテルで放出すべき場合、治療接合体または投与形態について所望の阻害活性を達成するために要求される治療投与量は、また、生体外の研究の使用により予測することができる。好ましい面において、注入カテーテルは便利には透過性膜をもつ二重のバルーンまたは四重のバルーンのカテーテルであることができる。1つの代表的態様において、治療接合体または投与形態の治療的に有効な投与量は、疾患

（例えば、アテローム性動脈硬化症、動脈瘤など）または血管外科的処置、例えば、血管形成、動脈切除、ステントの配置（例えば、血管の中）、血栓切除、および移植から生ずる血管の外傷的処置において有用である。動脈切除は、例えば、外科的切除、超音波およびレーザーの処置によるか、あるいは高圧の流体流により実行することができる。移植は、例えば、合成材料の特質を使用する血管の移植であるか、あるいは、例えば、器官の移植の間の、血管の吻口であることができる。当業者は認識するように、所定の血管の外科的処置（上の）のために適当な治療投与量は生体外および生体内の動物モデルの研究において、およびヒト

の前臨床の実験において決定される。下に提供される実施例において、ロリジンAおよびNR-AN-01を含有する治療接合体は、放射線標識化アミノ酸の取り込みにより判定されるように、被験細胞において細胞のタンパク質合成を少なくとも5~50%だけ阻害する濃度において、生体内で治療的に有効な投与量を達成した。

抗移動または抗マトリックスの治療剤を含有する接合体または投与形態の治療剤の場合において、それぞれ、生体外アッセイにおける細胞の移動および細胞の付着を使用して、血管壁の中に注入カテーテルによりつくられた流体空間において治療的に有効な投与量が到達される濃度を決定することができる。

本発明の1つの代表的な態様は注入カテーテルを使用する治療方法に関するが、認識されるように、薬物の放出の他の方法または投与のルート、例えば、静脈内、リンパ内、くも膜下、動脈内、移植された浸透圧ポンプによる局所的放出または他の腔内ルートは、また、有用であることができる。静脈内投与のために、本発明のナノ粒子の投与形態は好ましい。例えば、血管の透過性が漏れについて腫瘍において、ことに間質流体の中への粒子の漏れを可能とする、

損傷した血管を有する腫瘍の壊死区域において、増加する場合、および動脈壁が表皮剥離しそして外傷を受けて、膜媒質の間質区域へ粒子が入るのを可能とする場合において、ナノ粒子の静脈内投与は有用である。

有利には、カップリングしていない血管平滑筋結合性タンパク質（例えば、遊離のNR-AN-01抗体）を、治療剤の接合体または投与形態の投与前に、投与して、交差反応性部位への非特異的結合のブロッカーを提供する。このような部位のブロックは重要である。なぜなら、血管平滑筋結合性タンパク質は一般に所望の平滑筋細胞以外の組織中の細胞との交差反応性のレベルが多少低いからである。このようなブロッキングは特定の血管部位における治療接合体または投与形態の局在化を、例えば、細胞への有効な治療接合体を多くすることによって、改良することができる。1例として、カップリングしない血管平滑筋結合性タンパク質は、治療接合体または投与形態の投与前の、約5分~約48時間、最も好ましくは約5分~約30分に投与される。本発明の好ましい態様において、非標識化の特定

の「ブロッカー」は抗体の1価または2価の形態(例えば、全抗体または抗体のF(Ab')₂, Fab, Fab', またはFv断片)である。抗体1価の形態は治療接合体または投与形態の変位を最小と同時に非特異的交差反応性のブロッキングを最大にするという利点を有する。カップリングしない血管平滑筋結合性タンパク質は、患者における非特異的交差反応性部位の少なくとも一部分の結合をブロックするために有効な量で投与される。この量は、因子、例えば、患者の体重および結合性タンパク質の特質に従い変化することができる。一般に、約0.06mg~0.20mg/kg体重またはそれ以上の非標識化の特定のブロッカーをヒトに投与する。

さらに、治療接合体または投与形態の投与前に、第2の無関係の

血管平滑筋結合性タンパク質を必要に応じて患者に投与して、組織への治療接合体または投与形態の非特異的結合を減少することができる。好ましい態様において、無関係の結合性タンパク質は、患者の部位に抗原特異的結合を通して結合しないが、その代わり非特異的方法で、例えば、Fcレセプター結合性細胞内細胞、アシアロ(asialo)ーレセプターの結合を通して、そしてユビクイチン発現細胞への結合により結合する抗体であることができる。無関係の「ブロッカー」は治療接合体または投与形態の非特異的結合を減少し、こうして治療接合体または投与形態の使用に関連する副作用、例えば、組織の毒性を減少する。無関係の「ブロッカー」は、治療接合体または投与形態の投与前の、約5分~約48時間、最も好ましくは約15分~1時間に投与されるが、時間の長さは治療接合体および注入のルートまたは方法に依存して変化することができる。無関係の「ブロッカー」の代表例は、試験したとき、特定の方法で(例えば、 $K_a < 10^3 / M$ で)ヒト細胞膜の標的に結合しないことが発見された、動物源から調製された、ヒト組織およびレセプターまたは細胞または血清タンパク質と非反応性である抗体を包含する。

認識されるように、本発明の接合体および投与形態は使用において血管形成後の治療に制限されず;むしろ、治療接合体および投与形態の有用性は血管壁における平滑筋細胞および血管周囲細胞の細胞活性を阻害するそれらの能力により禁止されるであろう。こうして、本発明の他の面は、初期の治療的関与においてアテローム性動脈硬化症のプラークおよび血管壁の肥大および/または過形成の

区域を減少、遅延、または排除（およびさらに逆転）するために有用である治療接合体および投与形態およびプロトコルを包含する。本発明の治療接合体および投与形態は、また、初期関与のためにアテローム性動脈硬化症前の状態において実用性を見出す、例えば

、それらはアテローム性動脈硬化症を発生する高い危険にあるか、あるいは血管壁の肥大のために血管のアテローム性動脈硬化症の変化または血管の狭窄から生ずる高血圧の徴候をもつ患者において有用である。

本発明の治療接合体および投与形態は、また、障害のある血管組織および上皮の創傷を包含する多数の種類創傷部位における内皮細胞の再生を増強する治療的条件において使用することができる。これらの治療的条件において、本発明の治療接合体および投与形態は血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の移動および／または増殖の阻害において実用性を見出す。平滑筋細胞および血管周囲細胞は内皮細胞の増殖を阻害する生体外の因子の産生に関係づけられてきており、そしてそれらの増殖は、また、連続的内皮の確立に対する物理的バリエーションを生ずることがある。こうして、本発明の治療接合体および投与形態は、例えば、治療、血管移植の間および血管手術後の新血管形成および再内皮化の増加を促進するとき実用性を見出す。投与形態は、また、損傷した血管壁の再内皮化を刺激または加速する解放治療条件であることができる。この目的のための治療剤の例は血管透過因子である。

本発明のなお他の面は、血管部位における創傷の治療を増強しかつ治療した血管組織の構造的および弾性特性を改良する治療的条件に関する。本発明の治療接合体または投与形態を使用するこれらの治療的条件において、すなわち、血管壁における血管平滑筋細胞または血管周囲細胞の移動および増殖を阻害するために、血管の治療の強さおよび品質は改良されるであろう。血管の創傷部位における平滑筋細胞は、創傷の治療を促進する創傷部位の収縮の正常のプロセスに寄与する。平滑筋細胞の移動および増殖および形質転換された平滑筋細胞によるマトリックスの分泌はこの正常プロセスから外

れ、そして治癒した血管の長期の構造的および弾性的品質を障害すると現在と信じられる。こうして、本発明の他の面は、平滑筋および血管周囲細胞の増殖および移動ならびに形態学的形質転換を阻害し、そして治癒した血管系の品質を改善する治療接合体および投与形態を提供する。

本発明は、また、細胞破壊性治療接合体および細胞破壊性治療剤を包含する組み合わせの治療法を提供する。細胞破壊性接合体は、血管平滑筋細胞に特異的に局在化することができる結合相手（例えば、タンパク質またはペプチド）およびこのような細胞を殺すことができる活性剤を含む。細胞破壊性接合体は、好ましくは静脈内にまたは任意の他の便利なルートを通して、投与されて、標的平滑筋細胞に局在化し、そして狭窄または再狭窄の事象に関係する増殖する細胞を破壊する。この細胞の破壊はミトゲンの解放および他の代謝の事象を引き起こし、これらの事象は、引き続いて、血管平滑筋細胞の増殖に一般に導く。本発明の持続放出性の抗増殖または抗収縮投与形態は、次に、好ましくは注入カテーテルまたは任意の便利な投与形態で投与される。持続放出性投与形態は血管平滑筋細胞の増殖および／または移動および収縮を遅延し、これにより管腔の直径を維持する。この処置法は血管平滑筋細胞の過形成などから生ずる狭窄性血管において有用な生物学的動脈切除を構成する。

本発明は、また、ターゲットド粒状投与形態の局所的投与を通して癌および免疫系仲介疾患の処置方法を提供する。粒状投与形態は、例えば、癌の標的細胞の一次および／または転移性のフォーカスの中に局所的に投与される。局所的投与は、好ましくは、注入針または管腔内の投与のルートを使用して実施されて、腫瘍組織の取扱説明書領域において、あるいは腫瘍細胞を取り囲む管腔流体の中に粒状投与形態を注入する。

一次フォーカスの導入は、好ましくは、一般に哺乳動物内の限られた区域に位置する標的細胞、例えば、腹腔の中に位置する卵巣癌に関して実施される。一夜間投与形態は標的細胞の集団に結合しそして、必要に応じて、治療剤の経時的解放のためのその中に内化される。このような一次フォーカスへの本発明の投与形態の局所的投与は、他の感受性の器官、例えば、骨髄および腎臓の治療剤への

暴露を制限して、このような標的細胞への局在化作用を生ずる。

転移性フォーカスが標的細胞の集団を構成するとき、投与される微小粒子およびより大きいナノ粒子は注入部位に近く位置する標的細胞に主として結合しそして、必要に応じて、治療剤の解放のために内在化され、これにより注入部位を直に取り囲む標的細胞に対して顕著なかつ局在化した作用を発生する。さらに、より小さいナノ粒子は間質流体流またはリンパ排出チャンネルをたどり、そして注入部位に対して遠位の標的細胞に結合しそしてリンパ転移を行う。

本発明のこの態様のターゲット投与形態は、いっそう普通の免疫接合体の治療と組み合わせて使用することができる。この方法において、免疫接合体は全身の毒性の限界内で全身的作用を達成するが、本発明の投与形態は濃縮されかつ持続された投与量の治療剤を、このような「全身的」免疫接合体の投与単独から不適切な治療的投与量をしばしば受け取る、一次および転移性フォーカスに放出し、そして全身的毒性作用を回避するか、あるいは最小とする。

標的細胞の集団が局所的投与によりアクセス可能である場合、本発明の投与形態は免疫系仲介疾患を抑制するために利用される。このような疾患の例は関節炎、スプルー、ブドウ膜炎、眼内炎、角膜炎などである。本発明のこれらの態様に関係する標的細胞の集団は体腔または空間、それぞれ、関節嚢、胸腔、体腔、眼および結膜下

の空間に限定される。局所的投与は、好ましくは、胸内、腹腔内、眼内または結膜下の投与のルートのために注入針を使用して実施される。

本発明のこの態様は、全身的免疫系細胞への作用を最小にして、免疫系細胞のいっそう強い、局在化された変調を提供する。必要に応じて、免疫系の全身的細胞は結合性タンパク質またはペプチドに接合された化学療法剤で同時に処置することができる。このような接合体は好ましくは血管管腔から標的免疫系細胞の中に侵入する。

局所的粒状投与形態の投与は、また、増殖するように刺激された正常組織に局在化させ、これによりこのような病理学的（すなわち、活動過剰的）状態を減少または排除することができる。本発明のこの態様の1例は、新脈管系形成組織の

血管周囲細胞および平滑筋細胞に局在化する結合性タンパク質またはペプチドで被覆された、粒状投与形態の眼内投与を包含する。これらの血管周囲細胞の増殖は眼の退行変性疾患を引き起こす。本発明の好ましい投与形態は、標的細胞の集団の病理学的増殖を抑制できる化合物を解放する。好ましい投与形態は、また、血管管腔区域および血流を増加する化合物を解放し、この血液投与形態の減少により生成する病理学的変更に減少することができる。

本発明のなお他の面は、血管形成または他の血管外傷後の拡張した管腔体積を維持する治療的理学療法に関する。本発明のこの面の1つの態様は、血管平滑筋細胞の収縮能力を阻害することができる治療剤の投与を包含する。本発明のこの面の実施において有用な物質の例は、正常の血管の静水圧（すなわち、血圧）が弛緩性血管をその最大の生理学的直径にまたはその付近に拡張させるように、外傷を受けた動脈が血管の緊張を損失するようにさせる物質である。血管の緊張の損失は、収縮タンパク質（例えば、アクチン、トロポ

マイシン、カルデスモン、カルポニンなど）の形成または機能を妨害する物質により引き起こすことができる。この妨害は、例えば、カルシウムの変調、リン酸化または血管平滑筋細胞の収縮に關係する他の代謝経路の阻害を通して、直接または間接的に起こすことができる。

細胞の収縮（すなわち、血管の緊張の損失）の阻害は2つの機構を通して働いて、血管の狭窄の程度を減少させることができる。第1に、延長した期間の間の細胞の収縮の阻害は、膜煤質から内膜の中に移動する平滑筋細胞の数を制限し、内膜の厚さの増加は血管管腔の狭窄を生ずる。第2に、細胞の収縮の阻害は正常血管静水圧（すなわち、血圧）下に平滑筋壁を弛緩および拡張させる。治療剤、例えば、サイトカラシンは、外傷を受けた、血管形成後の、あるいは他の外科的または疾患的に損傷した平滑筋細胞がそれら自体の修復に必要なタンパク質合成を壊滅させないで、平滑筋細胞の収縮を阻害する。タンパク質合成は、また、平滑筋細胞がマトリックスを分泌するために必要であり、このマトリックスは血管の損傷が安定化するとき、管腔をその最大の収縮直径付近の状態に固定または保持する（すなわち、生物学的に誘発されたステント作用）。

この生物学的ステンティング (stenting) 作用は血管管腔区域を拡張させそして血管を通る血液の流速を増加するばかりでなく、かつまた血管形成後の弾性的反動を有意に減少させる。弾性的反動は、血管形成の間のバルーンカテーテルによる血管の過度の伸長から生ずる外傷ショックのために、血管痙攣または筋肉壁の弛緩に関連する血管の急性閉鎖である。管腔区域の減少に導く膜媒質のこの痙攣はバルーン拡張後数時間、数日または数週以内に起こり、このとき血管筋壁の回復が起こる。動脈切除の標本の顕微鏡検査の間の最近の観察が示唆するように、弾性的反動は、初期の処置後の血管造

影図に基づいて、首尾よく分類された血管形成処置の25%までにおいて起こることがある。生物学的ステンティング処置はバルーン血管形成後の動脈壁を弛緩させるので、臨床医は、血管痙攣または弾性的反動を減少または遅延するための手段として、過度の膨脹およびその結果生ずる外傷ショックを排除することができる。過度の膨脹の減少または排除は血管の筋肉壁への外傷を減少し、これにより内膜における平滑筋細胞の増殖の決定因子減少し、したがって、再狭窄の発生または重症を減少する。

生物学的ステンティングは、また、血栓の形成の発生を減少する。サイトカラシンBで処理したブタ大腿動脈において、壁の微小血栓の発生は治療剤で処置しなかったバルーンで外傷を受けた動脈に比較して減少した。この現象は、外傷を受けた血管を通る血流の増加から生じうる二次的利益であるように思われ、前記利益は本発明の実施を通して得られる。

サイトカラシン類は、血管平滑筋細胞への生物学的ステンティングの作用を発生することができる治療剤の例である。サイトカラシン類は、アクチンと相互作用することによって、血管平滑筋細胞の移動および収縮の両方を阻害すると考えられる。サイトカラシン類はフィラメント状アクチンの末端と相互作用してアクチンのフィラメントの伸長を阻害する。低い投与量のサイトカラシン類 (例えば、サイトカラシンB) は、また、アクチンのミクロフィラメントの網状組織を崩壊させる。生体外のデータが示すように、血管平滑筋細胞がサイトカラシンBを除去した後、細胞は約24時間以内に十分な重合したアクチンを再生して移動を再

開する。生体内の評価において、血管平滑筋細胞は2～4日以内に血管の緊張を再び獲得することが明らかにされた。管腔直径の固定および生物学的ステンティング作用が起こるのは、この回復期間の間である。

治療剤をターゲティングすることができるが、好ましくは血管形成または他の外傷事象後に外傷を受けた血管に直接投与する。例えば、サイトカラシンBの生物学的ステンティング作用は、約 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の投与濃度で血管壁の外傷を受けた領域の中に治療剤を単一に注入して達成される。

血管平滑筋細胞の移動（膜媒質から内膜への）の阻害は、同一投与量範囲において証明された（実施例11）：しかしながら、治療剤への血管の持続した暴露はこれらの抗移動作用を最大するために好ましい。血管平滑筋細胞が内膜の中に移動することができない場合、それらはそこで増殖することができない。血管平滑筋細胞が内膜へ移動する場合、引き続いて投与された抗増殖性持続放出性投与形態は内膜の増殖を阻害する。その結果、サイトカラシンまたは他の抗増殖治療剤を含有する本発明の持続放出性投与形態は、遊離サイトカラシン治療剤と組み合わせ投与することができる。この方法において、生物学的ステンティング作用、ならびに抗増殖または抗移動作用は、単一の投与のプロトコールで達成することができる。

本発明のプロトコルにおいて有用である作用物質は例えば以下の手順に従って同定可能である。自由な作用物質投与（つまりターゲティングされていない）のための潜在的な作用物質は、以下の特性のうちの単数又は複数のものを示す：

(i) 血管形成術（例えばPTCA、経皮経管血管形成（PTA）など）又はアテローム切除（例えばrotablater、レーザーなど）、冠動脈バイパス手術などを含むその他の外傷の後の又は血管の病気（例えばアテローム硬化症、血管狭窄症又は萎縮症に二次的に起こる眼の病気、脳血管狭窄症など）の結果として生じる拡張した管腔体積を保持する；

(ii) 作用物質によって容易になった管腔面積の初期増加の結果と

して管腔の慢性的狭窄をもたらしたり又はこの狭窄を強調したりしない；

(iii) 標的細胞の収縮又は移動を阻害する；

及び

(iv) 細胞増殖抑制性をもつ。

好ましくは、ここで利用される治療用作用物質は、4つの特性の全てを有することになる；しかしながら、本発明の実施のためには第1及び第3の特性が第2及び第4の特性よりも重要である。例えばサイトカラシンBは自由な治療用作用物質のプロトコルにおいて使用することに対する適性を決定する目的で評価された。サイトカラシンBの生物学的ステント効果は、1mlにつき約0.1ミリグラムから約1.0ミリグラムの用量濃度範囲で血管壁の外傷を受けた領域内に治療用作用物質の輸液を一回用いることによって、達成することができる。

本発明の持続放出性の実施態様において有用な作用物質は、以下の特徴のうちの単数又は複数のものを示す：

(i) 血管形成術（例えばPTCA、経皮経管血管形成（PTA）など）又はアテローム切除（例えばrotablater、レーザーなど）、冠動脈バイパス手術などを含むその他の外傷の後の又は血管の病気（例えばアテローム硬化症、血管狭窄症又は萎縮症に二次的に起こる眼の病気、脳血管狭窄症など）の結果として生じる拡張した管腔体積を保持する）；

(ii) 標的細胞の増殖を阻害する（例えばこの作用物質に対してインビトロで5分及び24時間露呈した後、血管平滑筋組織培養は、一定レベルの³H-チミジン摂取阻害を立証し、好ましくは比較的低い³H-ロイシン摂取阻害を示す）；

(iii) DNA合成を阻害するのに十分な用量で、穏やかから中位まで

の（例えば以下で記述する検定においてグレード2又は3）形態学的な細胞毒性効果を生み出す；

(iv) 標的細胞濃度を阻害する；及び

(v) 細胞増殖抑制性をもつ。

前記属性のうちの1つ又は複数のものを示す治療用作用物質を固定した時点で、この作用物質を、それに対する血管平滑筋細胞のより長時間の露呈が関与する第2の試験プロトコルに付す。

本発明の持続放出性実施態様において有用な作用物質は、次のような特性を示す：

(i) 長時間（例えば5日間）の露呈時点で、作用物質は、上で5分及び24時間の露呈について記述したものと同一又は類似の血管平滑筋組織培養DNA合成及びタンパク質合成に対するインビトロ効果を生み出す；及び

(ii) DNA合成阻害についての長期インビトロ検定において、有効な用量で、作用物質は、より長い期間（例えば10日間）にわたり穏やかから中位までの形態学的細胞毒性効果を示す。

本発明の範囲内での潜在的な抗増殖性作用物質のさらなる評価が、インビトロでのバルーンで外傷を受けたブタの大腿動脈モデルにおいて行なわれる。好ましくは、このような作用物質は、組織収集及び組織学的評価に先立つ1時間の「BRDU閃光標識付け」によって示されるように中膜血管平滑筋細胞内での細胞増殖の50%以上の阻害を立証する。作用物質が、1図の露呈で内膜平滑筋増殖を50%以上阻害するのに十分な時間有効であるならば、それは、持続放出性用量形態での投与を必要としない本発明の範囲内の作用物質である。全身時毒性及び潜在的な治療指数が、静脈内投与により50%の阻害を達成するのを可能にするようなものであると思われる場合、又は有効な抗増殖用量にて持続放出によって血管平滑筋細胞に対し局

所的に送り出すように作用物質を導くことができる場合には、さらに短かい持続時間の活性をもつ作用物質を持続放出のために評価する。持続放出性作用物質は用量最適化及び効力の研究のため持続放出性用量形態で評価される。好ましくは、本発明の実施において有用な抗増殖性作用物質は、バルーン外傷を受けたブタの大腿動脈内で血管狭窄を50%減少させ、さらに好ましくは、ブタの冠動脈内で同程度まで血管狭窄を減少させる。このとき、かかる作用物質をヒトの臨床試験にて評価することが可能となる。

細胞増殖（すなわちDNA合成）の阻害は、作用物質の持続放出のための主要な特徴である。例えば、スタウロsporinは、投与された用量で細胞増殖抑制性を有するように³H-ローイシン及び³H-チミジンの摂取の間の差を示す。より長い

時間の細胞障害性研究は、治療作用物質に対する長時間の露呈が標的細胞に対して不利な影響を及ぼさないことを示した。さらに、BRDUパルス法によると、スタウロスポリンが標的細胞の増殖を阻害することがわかった。しかしながら、細胞増殖能力を評価するための適切なあらゆる方法を代替的に使用することができる。従って、スタウロスポリンは、拡張した管腔体積を保持するのに有効である。

本発明は、以下の特定の例を参照することによってより良く理解できることだろう。

例 1

インビボでの血管壁内血管平滑筋細胞に対する結合

図 1 は、NR-AN-01 の静脈内投与から 4 日目の、24 才の男性患者の動脈血管壁内の平滑筋細胞に対する NR-AN-01 (マウス IgG2b Mab) の結合を示している。図 1 は、切片が半ビボで HRP 接合されたヤギ抗マウス IgG と反応させられた、NR-AN-01 投与後の患者の動脈

壁の内側領域を通して採取された組織学的切片の顕微鏡写真である。NR-AN-01 Mab との HRP 接合体の反応は、ペルオキシダーゼ基質 (色原体) として 4-クロロー 1-ナフトール又は 3, 3'-ジアミノベンチジントラヒドロクロリドを付加することによって視覚化された。基質の反応生成物は、反応部位において、不溶性の紫色又は暗褐色の沈降物を形成する (図 1 に # 2 で示す)。膠原性の細胞外基質物質 (図 1 に # 2 と示す) 又は細胞核 (# 1, 図 1) を視覚化するために、対比染色が用いられた。平滑筋細胞は、顕微鏡検査で紫色に染色された細胞として視覚化される。この顕微鏡写真は、インビボでヒトの血管平滑筋に特異的に統合しかつ細胞により内在化されて、さらに長い期間細胞内にとどまる Mab の能力を実証している。

例 2

トリコテセン治療作用物質を含む治療用接合体

NR-AN-01 と呼ばれるモノクローナル抗体に対して (以下に記述するとおり) トリコテセン細胞毒素のヘミスクシネート誘導体を化学的にカップリングさせる

ことによって、NR-AN-01及びロリジンAの接合体を構築した。2つの接合体は、一方がロリジンAの2'位置に、もう一方が13'位置にカップリングされた状態で調製された。この合成において、図2及び図3に記されている2つの方式を使用した。次に、接合体を、PD-10 SEPHA ROSE® カラムクロマトグ

ラフィ (Pharmacia; Piscataway, NJ) によって未反応のロリジンAから精製し、サイズ排除高压液体クロマトグラフィーによって分析し、次にカラム画分を以下に記述する通りSDS-PAGE及び等電点電気泳動 (IEF) によって特徴づけた。

図2は、室温 (RT) でジクロロメタン (CH_2Cl_2) 内に存在する無水コハク酸、トリエチルアミン (NEt_3) 及びジメチルアミノピリジ

ン (DMAP) を用いて、及びRTで同じく CH_2Cl_2 内でN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 及びジクロロヘキシルカルボジイミド (DCC) 試薬を用いて、という試薬を使った2段階プロセスを通してのロリジンAヘミスクニルスクシンイミデート (RA-HS-NHS) の合成のための第1の反応方式を概略的に示している。

図3は、室温 (RT) でジメチルホルムアミド (DMF) 中の塩化t-ブチルジメチルシリル (TMMS-Cl) 及びイミダゾールを用いて、RTでジクロロメタン (CH_2Cl_2) 内の無水酢酸、トリエチルアミン (TEA) 及びジエチルアミノピリジンをを用いて、RTで (CH_2Cl_2) 内の無水コハク酸、トリエチルアミン (TEA) 及びジメチルアミノピリジン (DMAP) を用いて、及びN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) 及びジクロロヘキシルカルボジイミド (DCC) 試薬を用いてといった、試薬を使った5段階プロセスを通しての、ロリジンAヘミスクニルスクシンイミデート (RA-HS-NHS) の合成のための第2の反応方式を概略的に示している。

2'-ロリジン-A-ヘミコハク酸 (2) の合成:

0.5 g (0.94mmol) のロリジンAに対して、15mlのジクロロメタンを付加した。この溶液に対して、攪拌しながら0.104 g (1.04mmol) の無水コハク酸を付加した。反応混合物に対し、5mlのジクロロメタン中の、0.2mlのトリエチルアミンを付加した。均質な反応混合物に対して、触媒量のジメチルアミノピリジンを付加し、15時間室温で攪拌した。反応の完了後、薄層クロマトグラフィを行なっ

た（数滴の酢酸を伴って、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9.7 : 0.3$ ）。反応終了後、0.3mlの氷酢酸を付加し、減圧下で溶剤を除去した。乾燥した粗製残留物は、水と塩化メチレンの間で分割された。無水硫酸ナトリウム上で組合さった塩化メチレン抽出物（ $3 \times 50\text{ml}$ ）を乾燥させ、真空下で溶剤を除去して、3つの化合物の粗製混合物を0.575 g

（96%）を得た。2%の酢酸を伴う50%のアセトニトリル・水の中の粗製混合物の予備的C18HPLC分離は、白色固体として0.36 g（60%）の2を生み出した。

スクシンイミジル2'-ロリジンAヘミスクシネート（3）の合成：

30mlのジクロロメタン中の2'-ロリジンAヘミコハク酸0.3 g（0.476mmol）に対して、0.055 g（0.487mmol）のN-ヒドロキシスクシンイミドを付加した。清澄な反応混合物に対して、0.108 g（0.524mmol）のジシクロヘキシルカルボジイミドを付加した。6時間室温で反応混合物を撹拌した。反応終了後、顕色用溶剤として（数滴の酢酸を伴う、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{CH}_3\text{OH} = 9.7 : 0.3$ ）を用いてTLCを行なった。反応混合物に対して数滴の氷酢酸を付加し、溶剤を減圧下で除去した。乾燥残留物に対してジクロロメタンを加え、沈降させたDCUをろ過した。ろ液からの溶剤を、減圧下で除去し、白色固体を得た。粗製生成物から、流動層として2%の酢酸を用いて50%のアセトニトリル中で予備的HPLCにより、0.208 g（60%）の3を精製した。

13'-t-ブチルジメチルシリルロリジンA（4）の合成：

0.5mlのジメチルホルムアシド溶液中の72.3mg（0.136mmol）のロリジンAに対して、0.055 g（0.367mmol）の塩化t-ブチルジメチル及び0.025 g（0.368mmol）のイミダゾールを付加した。反応混合物を15時間室温で撹拌した。反応完了後、顕色用溶剤として1%の $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$ を用いてシリカゲル薄層クロマトグラフィを行なった。反応混合物からの溶剤を、真空下で除去し、乾燥させた。粗製生成物を、水と塩化メチレンの間で分割させた。組合わされた塩化メチレン抽出物からの溶剤を、減圧下で除去し、乾燥させた。溶離用溶剤として $\text{EtOAc} : \text{ヘキサ}$ ン（1 : 3）を用いて閃光クロマトグラ

フィにより、精製生成物を精製した。溶離液からの溶剤を、減圧下で除去して、固体として0.66 g (75%) の4を得た。

13' - t-ブチルジメチルシリル2アセチルロリジンA (5) の合成:

10mlのジクロロメタン中の0.1 g (0.155mmol) の13' - t-ブチルジメチルシリルロリジンAに対して、0.3mlの無水酢酸、0.2mlのトリエチルアミン及び数個のジメチルアミノピリジン結晶を付加し、2時間室温で保管した。反応の完了後、顕色用溶剤としての1%メタノール-塩化メチレン中でTLCを行なった。減圧下で溶剤を除去し、溶離用溶剤として1%のメタノールクロロホルムを用いてシリカゲルカラムによりこれを精製した。溶離液からの溶剤を真空下で除去して、固体として0.085 g (80%) の5を得た。

2' アセチルロリジンA (6) の合成:

5mlのテトラヒドロフラン中の0.05 g (0.073mmol) の2' -アセチル13' - t-ブチルジメチルシリルロリジンAに対してTHFの0.3mlの1Mのテトラブチルフッ化アンモニウム溶液を付加した。室温で2時間、反応混合物を撹拌した。反応完了後、顕色用溶剤として1%のMeOH-CHCl₃を用いてシリカゲル薄層クロマトグラフィを行なった。反応混合物からの溶剤を、減圧下で除去し、乾燥させた。溶離用溶剤として1%のCH₃OH-CHCl₃を用いてシリカゲル上で、粗製生成物を精製した。組合された溶離液からの溶剤を真空下で除去して、0.020 g (48%) の6を固体として得た。

2' -アセチル13' -ヘミスクシニルロリジンA (7) の合成:

1mlのジクロロメタン中の0.05 g (0.087mmol) の2' -アセチルロリジンAに対して、0.025 g (0.25mmol) の無水コハク酸と35mlのトリエチルアミンを付加した。触媒として、数個のジメチルアミノピリジン結晶を付加した。反応混合物を室温で24時間撹拌した。

反応完了後、顕色用溶剤として5%のMeOH-CH₂Cl₂を用いて薄層クロマトグラフィを行なった。反応の終了時点で30mlの氷酢酸を付加した。反応混合物からの溶剤を、減圧下で除去し乾燥させた。粗製生成物は水と酢酸エテルの間で分割させた。減圧下で、組合わせた酢酸エテル画分からの溶剤を除去した。粗製生成物を

シリカゲルカラムを通して精製し、0.039 g (66%の7)を白色固体として得た。

スクシンミジル2'-アセチル13'-ロリジンAヘミスクシネート (8) の合成：

2 ml のジクロロメタン中の0.036 g (0.0050 mmol) の2'-アセチル13'-ロリジンAヘミコハク酸に対して0.009 g (0.09 mmol) のN-ヒドロキシスクシイミドを付加した。攪拌した溶液に対して、0.012 g (0.059 mmol) のジシクロヘキシルカルボジイミドを付加した。反応混合物を、8時間室温で攪拌した。反応完了後、顕色用溶剤として5%のMeOH-CH₂Cl₂を用いてシリカゲル薄層クロマトグラフィを行なった。反応混合物に対して数滴の水酢酸を付加した。反応混合物からの溶剤を、減圧下で除去し、乾燥させた。溶離用溶剤として5%のMeOH-CH₂Cl₂を用いてシリカゲルカラム上で粗製生成物を精製させた。組合せた溶離液からの溶剤を真空中で除去して、白色固体として0.025 g (61%) の8を除去した。

スクシンイミジル2'-ロリジンAヘミスクシネート (3) とスクシンイミジル2'-アセチル13'-ロリジンAヘミスクシネート (8) のNR-AN-01全抗体 (MAb) に対する接合 (コンジュゲーション)：

ゲル浸透クロマトグラフィによる精製に先立ち45分間穏やかに混合しながら室温で25%のジメチルスルフォキシド (DMSO) 溶剤の存在下でホウ酸緩衝液中でpH 8.0にて、接合反応を行なった。トリコセセン薬物前駆体抗体のモル提供比は、2' 及び13' ロリジンA類

似体 (3 及び 8) について、それぞれ25：1 及び40：1であった。抗体濃度は、接合反応中0.9～1.0 mg/mlであった。

25 ml の抗体との標準的な2' 類似体 (3) 反応は以下のとおりであった。

リン酸緩衝液 (すなわちPBS；150 mMのNaCl, 6.7 mMのリン酸塩、pH 7.3) 中1 ml につき5.3 mgのAb 4.7 mlに対して、10 mlのPBS及び5 mlのホウ酸緩衝液 (0.5 M, pH 8.0) を付加した。穏やかに攪拌しながら、反応混合物に対して、次に、1.37 mgのスクシンイミジル2' ロリジンAヘミスクシネート (3) を含む6.3 mlのDMSOを15秒間にわたり滴下で加えた。

精製：

精製するためには、PBS中で平衡化されたPharmacia PD-10セフ

ァロース® カラムに対して、1 mlの反応アリコートを加えた。2.4

～4.8 mlの画分で、溶離された接合体を収集した。次にPD-10で精

製した接合体アリコートをブールし、Amiconの PM-10 Dia-flow® 濃

縮器上で1.5～2.0 mg/mlまで濃縮させた：次に、0.2 μlのG

elman Acrodisc® を通して無菌ろ過し、5 mlの体積で無菌ガラスバ

イアル中に充てんした。

2' の接合体を液体窒素内で急速凍結させ、次に使用するまで-70℃で保管した。13' ロリジンA NR-AN-01接合体を凍結状態又は冷蔵状態（すなわち5～10℃）で保管した。

接合体の特徴づけ：

銅試薬方法（Pierce Chemical Corp.）を用いてBCA検定によりタンパク質濃度を決定した。

抗体誘導体化の度合の評価は、4時間（2' 接合体については室温で又は13' 接合体については37℃で）pH10.3の0.2Mの炭酸塩中で接合体アリコートをまず加水分解させ、次にPM-30膜を通してろ

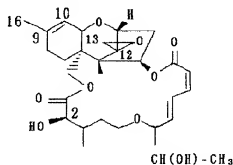
過することによって行なった。次にそれぞれ50：48：2のCH₃CN：H₂O：HOAc比の流動層を用いてC-18逆相HPLC上でロリジンAについてろ液を検定した。13' 接合体の加水分解中極性生成物を生成する平行した大環状環分解について補正するべく、1.32の補正係数を用いた。

DuPont Zorbax® HPLC上でのサイズ排除クロマトグラフィ及び S erva® ゲル平板（pH 3～10）を用いた等電点電気泳動も同様に行なわれた。HPLCによっては、いかなる凝集の兆候も観察されなかった。

ストレプトアビジン／ペルオキシダーゼ検出を伴うビオチニ化-Abを用いた競合ELISAによって、又は¹²⁵Iで標識付けされた抗体を用いた競合細胞結合検定

によって、ロリジン A-抗体接合体の免疫検定を行なった。代替的には、免疫反応性は、抗体がまずクロミン T 方法により I-125 で追跡標識づけられ次に引き続き 2' 及び 13 ロリジン A 前駆体で誘導体化される細胞結合検定において抗体飽和条件下で測定された。

トリコテセンの構造式は以下のとおりである：



例 3

平滑筋細胞に対する結合の反応速度論

静脈内カテーテルによる投与のためには、本発明の治療用接合体

が 3 ～ 5 分以内に投与され、かくして患者の体内で血液流が再度樹立され得ることが望ましい。従って、109 リットル／モルを上回る K_a で平滑筋結合タンパク質の結合反応速度を決定するための研究が行なわれた。ヒトの血管平滑筋細胞は培養中でゆっくりと成長し、比の平滑筋細胞はヒトの CSPG 細胞表面標識を発現することがわかっていたことから；以下の例で記述する研究の多くにおいて、CSPG 表面標識を支持する B054 比動脈平滑筋細胞及びヒトの A375M/M（黒色腫：ATCC#CRL1619）細胞を使用した。

反応速度論的な結合の研究のためには、2500 細胞／ウェルの割合で、無菌 96 ウェルマイクロタイタープレートの中に A375M/M 及び B054 細胞を播種した。プレートをアルミホイルの中に包み込み、5 % CO₂ / 95 % 空気加湿雰囲気内で一晩 37 °C でインキュベートした。約 18 時間後、インキュベーションプレートを除去し、膜の反転を防ぐため 5 分間 0.05 % のグルタルアルデヒドで細胞を固定した。固定の後、プレートを、0.5 % の Tween-20® を含む PBS で徹底的に

(PBS中5%のニトリリ血清／0.5%のTween20®)を加えた。CS緩衝液を除去し各ウェルに100mlのHRP接合されたヤギの抗マウスIgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)を加え、1時間4℃でインキュベートし、未結合のヤギIgGを除去すべくPBS／0.05%Tween®で洗浄し、2, 2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)色素産生基質(すなわちHRPに対して)を加えることによって、細胞に結合したNR-AN-01治療用接合

図4 Aは、NR-AN-01のさまざまな濃度(NRAN01 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で5分間(開放正方形、図4 A)、15分間(閉鎖菱形、図4 A)、30分間(閉鎖正方形、図4 A)又は60分間(開放菱形、図4 A)、A375

図4 Bは、図4 Aに関して上述したものと類似する要領で、ただしA375m/m

細胞の代りにB054標識陽性の平滑筋細胞を用いて行なわれたインビトロ研究の結果をグラフで表わしている。

図4A及び図4Bに示された結果は、20ng/mlという最低の用量でさえ4℃で5分以内にA375及びB054細胞に対するNR-AN-01の有意な結合を示している。

実施例4

ロリジンRoridin A 及びRA-NR-AN-01抱合体の効果

細胞タンパク質合成（即ち³H-ロイシン取り込みにより）及び代謝活性（即ちミトコンドリアMTT検定により）に及ぼすロリジン

A (RA) 及びRA-NR-AN-01接合体の作用を以下の実施例5及び6に詳述した実験で試験した。実施例4の実験は、薬剤による長時間（即ち24時間）処理の効果を測定するための実験を含む。実施例5の試験は、細胞に及ぼす“パルス”（即ち5分）処理の効果を測定するための実験を含む。両試験において、“標的”細胞（即ちCSPG“マーカー”を有する細胞）及び非標的細胞を含入することにより、効果の細胞特異性を評価した。比較のために、遊離RA（即ち非結合）も試験に含めた。細胞タンパク質合成又は代謝活性に及ぼす作用を処理直後に評価するかあるいは“回復期間”を置いて（即ち37℃で細胞を一夜インキュベートして）細胞集団に及ぼす薬剤の長時間効果を測定した。

24時間曝露後の代謝効果：

モノクローナル抗体-薬剤抱合体がin vivoで用いた場合にはマーカー抗原を保有する細胞に対してある程度の特異性を有することは公知である一方、特に親液性の化合物を用いて効果のin vitroでの特異性を立証することは多数の系においては困難であることが示されている。したがって、RA-NR-AN-01-ロリジンA抱合体の阻害作用を24時間に亘って標的及び非標的細胞に関して調べる本実験を実施した。RA-NR-AN-01を用いた場合の結果を同じく24時間の遊離ロリジンAの作用と比較した。修飾メチルテトラゾリウム青（MTT）検定を利用して臭化3-（4，5-ジメチルチアゾール-2-イル）-2，5-ジフェニルテトラゾリウム（Sigma）を用いて細胞代謝活性を測定した。この検定は、細胞ミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性を測定すると考えられる。これらの試験の幾つかに

関しては、M14（黒色腫）及びB054（平滑筋）細胞株をマーカー陽性標的細胞として、並びにHT29細胞（結腸癌；ATCC #HTB38）を非標的特異性対照として用いた。他の試験においては、A375をマーカー陽

性細胞として用いた。HT29及びM14細胞を96ウェルマイクロ滴定プレート中に 5.0×10^3 細胞/ウェルの濃度で、B054細胞を 2.5×10^3 細胞/ウェルで植え付けた。遊離ロリジンA及び2' RA-NR-AN-01（即ちNR-AN-01と2'位置でヘミスクシネート（HS）を介して結合するロリジンA）の連続2倍希釈液を20mg/ml-40mg/mlのタンパク質濃度範囲でDMEM中に調製した。被験物質をマイクロ滴定ウェルに加え（100ml/ウェル）（二通り）、プレートをアルミ箔でくるんで、5%CO₂/95%空気で構成される湿潤空気中で37℃で24時間インキュベートした。24時間後、培地を取り出し（吸引により）、新鮮なDMEMを加えて（100ml/ウェル）、細胞を戻してさらに一夜（即ち16-18時間）“回復期間”の間インキュベートした。“回復期間”終了時に、各ウェルに5mg/mlのMTT溶液20mlを加えて細胞代謝活性を測定した。プレートを覆い、37℃で4時間インキュベート後、100ml/ウェルの10%SDS/0.1N HClを加えることにより反応を起こした。16-18時間後に室温で暗青色可溶性ホルマザン反応生成物を生じ、570nmの吸光度でELISAマイクロ滴定プレート読み取り装置を用いて定量した。

図5Aは、*in vitro*試験の結果をグラフに示したものであり、この場合、B054マーカー陽性平滑筋細胞を異なる濃度のRA-NR-AN-01（NRAN01-RA；図5Aの白四角）又は遊離ロリジンA（遊離RA；図5Aの中黒菱形）と一緒に24時間インキュベートし、洗浄して、さらに16-18時間、一夜（o/n）回復期間の間培養に戻した後に、MTT検定で代謝活性を調べた。遊離RA及びRA-NR-AN-01の濃度は検定におけるロリジンAの算出濃度（対数目盛りでプロットした、mg/ml）（即ち本検定におけるNR-AN-01タンパク質の総mg/mlではなく）として表わされ、したがって直接比較が可能である。MTT検定における細胞の代謝活性は、細胞の対照未処理培養で測定さ

れる代謝活性のパーセンテージ（即ち%対照）として示される。

図5 Bは、図5 Aに関して上記したものと同様の方法で実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものであるが、この場合、3つの異なる細胞型、即ちB054マーカー陽性平滑筋細胞 (B054-NRAN01-RA；図5 Bの白四角)；HT29マーカー陰性対照細胞 (HT29-NRAN01-RA；図5 Bの中黒菱形)；及びM14マーカー陽性細胞 (M14-NRAN01-RA；図5 Bの中黒四角)に及ぼすRA-NR-AN-01 (NRAN01-RA) のみの作用を比較する。図5 Aに関して上記されているように、本実験における濃度は $\mu\text{g}/\text{ロリジンA}$ 1mgに換算して表される。細胞の代謝活性は、図5 Aと同様の方法で、即ち細胞の未処理対照培養で測定される活性のパーセンテージ (即ち%対照) として表される。

図5 A及び図5 Bに示した結果は、MTT検定で測定した代謝活性が、遊離ロリジンAあるいは2'又は13' RA-NR-AN-01抱合体において24時間インキュベーション後16-18時間目においてさえ、試験細胞の全集団で有意に減少したことを明示する。RA-NR-AN-01接合体の作用は、標的 (B054及びM14) 及び非標的 (HT29) 細胞に対して非特異的阻害性であると思われる (図5 A及び5 B)。阻害作用は、 $>10\text{ng}/\text{ml}$ の遊離ロリジンA又はRA抱合体濃度で観察された。

比較のために、細胞に及ぼすシュードモナス属Pseudomonas外毒素 (PE) 接合体の作用を同様のプロトコールで評価する二次試験を実施した。これらの試験に関しては、標的及び非標的細胞をPE又はPE-NR-AN-01で24時間処理後、MTT検定で代謝活性を調べる前に“回復期間” (上記) を置いた。

図6 Aは、図5 Aに関して上記したものと同様の方法で実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものであるが、この場合は、

細胞に及ぼすPE-NR-AN-01 (NRAN01-PE) (即ちRA-NR-AN-01ではなくて) の代謝作用を試験するよう意図した。3つの異なる細胞型、即ちB054マーカー陽性平滑筋細胞 (B054；図6 Aの白四角)；HT29マーカー陰性対照細胞 (HT29；図6 Aの中黒菱形)；及びM14マーカー陽性細胞 (M14；図6 Aの中黒四角)を用いた。この試験では、接合体の濃度は、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NR-AN-01タンパク質 (対数目盛りでプロット) で表し、代謝活性は未処理対照培養で測定されたMTT活性のパーセンテージ (%対照) として表す。

図6Bは、図6Aに関して上記した方法と同様の方法で実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものであるが、この場合、遊離PEを用いて得られた効果(PE)とPE-NR-AN-01を用いて上記で得られた効果(即ち図6A)とを比較するよう意図した。細胞、培養条件、算出法、及び結果の表示法は、上記図6Aの場合と同様である。

図6A及び図6Bに示した結果は、PE-NR-AN-01又は遊離ロリジンAへの24時間曝露は、 $>100\text{ng/ml}$ の濃度では細胞に対して非特異的阻害性を示した。

この型の非特異的阻害は生物学的アテロエクトミーにとって有益であるかもしれないと考えられる一方、死滅した並びに死に瀕した細胞が平滑筋増殖を刺激する因子を放出する可能性がある血管形成術後の再狭窄の治療には望ましいとは思えなかった。

実施例5

細胞活性に及ぼすパルス処理の効果

細胞に及ぼすロリジンA含有治療用抱合体への短時間、即ち5分間曝露の効果の評価するために別の試験を実施した。これらの試験では、代謝活性(MTT検定で測定)及び細胞タンパク質合成(^3H -ロイシン取り込みにより測定)の両方を評価した。

5分間曝露後の効果：タンパク質合成

遊離ロリジンA(RA)又は治療用抱合体への5分間曝露の効果を評価した。2'位置(2' RA-HS-NR-AN-01)又は13'位置(13' RA-HS-NR-AN-01)でヘミスクシニル(HS)を介して結合するロリジンA-NR-AN-01を用いた(13' RA-HS-NR-AN-01の場合はさらに、ロリジンAの2'位置をアセチル化した)。RA、2'又は13' RA-NR-AN-01抱合体を、 400ng/ml – 780pg/ml の濃度範囲の滅菌DMEM又はロリジンA中で2倍に希釈した(被験物質はすべてロリジンAに対して標準化したので、匹敵する用量で効果を直接比較することができた)。試料を2通りのマイクロ滴定プレート中に 100ml /ウエルでアリコート化(2通り)して、室温で5分間インキュベートした。

マーカー陽性A375及びマーカー陰性HT29細胞に及ぼす被験物質の短時間及び

長時間効果を測定した。短時間効果を試験するために、100ml/ウエルの $[^3\text{H}]$ ーロイシン(0.5mCi/ml)を抱合体(又はRA)の5分間処理直後に加え、タンパク質合成を4時間に亘って評価した。長時間効果を測定するためには、細胞を5分間処理し

、洗浄後、培養に戻して、5% NBS/5% Serum Plus® (即ちA37

5又はHT29細胞用)か又は10%FBS(即ちB054細胞用)を含有するDMEM培地中で24時間“回復”期間を置いた。“回復”期間終了時に、インキュベーション培地を取り出して(吸引により)、 ^3H ーロイシンを加えた(上記と同様)。いずれの場合も(即ち短時間でも長時間でも)、湿潤室(上記)中で37℃で4時間 ^3H ーロイシンを用いて細胞をインキュベートすることにより細胞のタンパク質合成を評価し、結果はすべて、非処理細胞(即ち100%対照)と比較することにより算出した。4時間後、 ^3H ーロイシンを除去し、トリプシン処理により基質から細胞を取り出して、吸引(PHDTM細胞収

穫装置(Cambridge Technology, Inc., Cambridge, MA)を用いて)し、ガラス繊維フィルター上で濾過して収集した。ガラス繊維フィルターを乾燥させて、Beckman液体シンチレーションカウンターでの液体シンチレーション分光測定により放射能を定量した。

図7Aは、*in vitro*試験の結果をグラフに示したものであり、この試験は、異なる濃度のロリジンA(遊離RA;図7Aの白四角)、又は2' RA-NR-AN-01(2' RA-NRAN01;図7Aの中黒四角)、又は13' RA-NR-AN-01(13' RA-NRAN01;図7Aの中黒三角)接合体への5分間曝露の対照HT29マーカー陰性細胞に及ぼす効果を調べるために実施した。遊離RA、2' RA-NR-AN-01又は13' NR-AN-01の濃度は本検定におけるロリジンAの算出濃度(対数目盛りでプロット、mg/ml)(即ちNR-AN-01タンパク質の総mg/mlというよりは)として表わされ、したがって結果の直接比較が可能である。これらの試験のために、細胞を5分間処理し、洗浄した後、4時間培養に戻し、この間培養培地に0.5mCi/mlの ^3H ーロイシンを加えることにより細胞タンパク質合成を評価した。4時間終了時に

、細胞タンパク質を収集して、放射能を測定した。結果は、対照（非処理）HT29細胞培養で記録された放射能のパーセンテージ（即ち%対照）として表される。

図7Bは、図7Aに関して上記したように、異なる濃度の遊離RA（図7Bの白四角）、2' RA-NRAN01（図7Bの中黒四角）、又は13' RA-NRAN01（図7Bの中黒三角）への5分間曝露の対照HT29マーカー陰性細胞に及ぼす効果を調べるために実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものであるが、本実験では、細胞を16-18時間回復期間（即ち一夜；o/n）インキュベートした後に4時間³H-ロイシンタンパク質合成検定でタンパク質合成を調べた。結果は図7Aに上記されていると同様の方法で示す。

図7A及び図7Bに示した結果は、HT29対照細胞によるタンパク質合成に及ぼすそれぞれRA、2' RA-HS-NR-AN-01及び13' RA-HS-NR-AN-01の短時間及び長時間効果を明示する。結果は、HT29細胞においては、RA-NR-AN-01によらずに、5分間インキュベーション中にRAにより引き起こされる阻害は16-18時間回復期間後も依然として明らかであった（図7B）。これに対比して、2' RA-HS-NR-AN-01又は13' RA-HS-NR-AN-01による非標的HT29細胞の処理は、タンパク質合成の検出可能な阻害を引き起こさなかった。したがって、これらの結果は（24時間に亘って上記で得られた結果ものに対比して）、処理が5分間“パルス”で加えられた場合には、NR-AN-01-接合体のin vitro作用に対する驚くほどの特異性を示唆すると思われる。しかしながら、NR-AN-01-抱合体が不活性である可能性もあり、そこでさらなる実験を実施して標的細胞に及ぼす接合体の効果を評価した。

図7Cは、図7Aに関して上記したように、異なる濃度の遊離RA（図7Cの白四角）、2' RA-NRAN01（図7Cの中黒四角）、又は13' RA-NRAN01（図7Cの中黒三角）への5分間曝露のA375m/mマーカー陽性細胞に及ぼす効果を調べるin vitro試験の結果をグラフに示す。本実験では、A375細胞を被験物質中で5分間インキュベートし、洗浄して、培地に0.5mCi/ml ³H-ロイシンを加えることにより、次の4時間のタンパク質合成を調べた。結果は図7Aに上記されていると同様の方法でプロットする。

図7Dは、図7Bに關して上記したように、異なる濃度の遊離RA（図7Dの白四角）、2' RA-NRAN01（図7Dの中黒四角）、又は13' RA-NRAN01（図7Dの中黒三角）への5分間曝露のA375m/mマーカー陽性細胞に及ぼす効果を調べるin vitro試験の結果をグラフに示す。本実験では、A375細胞を被験物質中で5分間インキ

ュベートし、洗浄して、16-18時間回復期間の間培養に戻して、その後タンパク質合成を4時間³H-ロイシントタンパク質合成検定中に調べた。実験の結果は図7Aに上記されているのと同様の方法でプロットする。

図7C及び図7Dに示した結果は、A375標的細胞によるタンパク質合成に及ぼすそれぞれRA、2' RA-HS-NR-AN-01及び13' RA-HS-NR-AN-01の短時間及び長時間効果を明示する。2' 又は13' RA-NR-AN-01治療用接合体による標的細胞の処理は、タンパク質合成の短時間（即ち5分間パルス処理直後に観察された）阻害を引き起こした（図7C）。これらの所見は、上記の図7A及び図7Bにおける所見と結びつけた場合には、RA-NR-AN-01接合体が活性であり、それらは非標的細胞ではなく、標的細胞に対して特異的に阻害性であったことを示唆する。面白いことに、“パルス”処理標的細胞を培養に戻した場合、長時間阻害効果は全く観察されなかった（図7D）。図7C及び図7Dに示した結果さらに、ロリジンAが試験細胞に対して非特異的に阻害性を有し（即ち上記図7A及び図7Bと同様の方法で）、細胞に及ぼすその効力は16-18時間回復期間後でさえ明らかであることを明示する。したがって、“パルス”処理中の標的細胞に及ぼすRA-NR-AN-01接合体の特異的効果は、NR-AN-01結合タンパク質の一特性であると思われる。

B054動脈平滑筋細胞に關して得られた結果は、上記のA375細胞に關して得られたものと同様であった。即ち、遊離ロリジンAは短時間出は200ng/ml, 100ng/ml及び50ng/mlで対照の60%、66%及び90%のタンパク質合成の用量-反応阻害を示し、長時間では、タンパク質合成に及ぼす効果は同一用量で対照の27%、46%及び98%であった。これに對比して、2' 又は13' RA-NR-AN-01はタンパク質合成に及ぼす短時間又は長時間効果に關しては10-20%阻害

(即ち対照の>80%)しか示さなかった。

したがって、結果は“パルス”療法として施された場合の標的細胞に及ぼすロリジンA-接合化NR-AN-01の短時間特異的可逆的效果を示す。しかしながら、これらの実験ではタンパク質合成のみを評価したため、細胞代謝活性が“パルス”処理の結果として細胞中で作用を及ぼしうることがあった。したがって、“パルス”処理後に細胞代謝活性を評価する別の試験を実施した。

5分間曝露後の効果：代謝活性

RA又はRA-NR-AN-01抱合体への標的及び非標的細胞の5分間曝露後48時間目にMTT検定を実施した。これらの試験における標的細胞としてはB054及びA375が挙げられ、非標的細胞としてはHT29細胞が挙げられる。滅菌96ウエルマイクロ滴定プレートに2500細胞/ウエルで接種して、アルミ箔でくるんで、5%CO₂/95%空気を含有する湿潤室中で16-18時間インキュベートした。ロリジンA(RA)、2' RA-HS-NR-AN-01及び13' RA HS-NR-AN-01の400ng/mlから780pg/mlまでの連続2倍希釈液を調製し、希釈液の100mlアリコートを通りのウエル中に分散させた。被験試料に5分間曝露後、細胞を洗浄して被験物質を取り出し、新鮮な培地を加えた。細胞を48時間の回復期間を置いた後に試験した。即ちプレートを48時間インキュベートし、次に20ml/ウエルの5mg/ml MTT溶液を加えることにより、細胞代謝活性を測定した。プレートを覆い、37℃で4時間インキュベートし、次いで上記のように反応を起こさせた(上記の実施例4参照)。暗青色可溶性ホルマザン反応生成物を16-18時間インキュベーション後に室温で生じさせた。570nmの吸光度でELISAマイクロ滴定プレート読み取り装置を用いて試料を定量した。

図8Aは、in vitro試験の結果をグラフに示したものであり、こ

の試験は、異なる濃度のロリジンA(図8Aの白四角)、2' RA-NR-AN-01(NRAN01-2' RA; 図8Aの中黒菱形)、又は13' RA-NR-AN-01(NRAN01-13' RA; 図8Aの中黒四角)への5分間曝露のB054マーカー陽性平滑筋細胞に及ぼす効果を調べるために実施した。実験は図7Bに関して上気したのと同様の方法で実施したが、しかし代謝活性は、図7Bの場合のようなタンパク質合成ではなく

MTT検定により検定し、細胞を48時間（図7Bの場合のような24時間ではなく）回復させた。図7Aに関して記載（上記）されたと同様の方法で実験結果をプロット化した。

図8Bは、異なる濃度のロリジンA（図8Bの白四角）、2' RA-NR-AN-01（NRAN01-2' RA；図8Bの中黒菱形）、又は13' RA-NR-AN-01（NRAN01-13' RA；図8Bの中黒四角）への5分間曝露のA375m/mマーカー陽性細胞に及ぼす効果を調べるために実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものである。本実験は、図8Aに関して上記したものと同様の方法で実施した（そして結果をプロット化した）。

図8Cは、異なる濃度のロリジンA（図8Cの白四角）、2' RA NR-AN-01（NRAN01-2' RA；図8Cの中黒菱形）、又は13' RA-NR-AN-01（NRAN01-13' RA；図8Cの中黒四角）への5分間曝露のHT29マーカー陰性細胞に及ぼす効果を調べるために実施したin vitro試験の結果をグラフに示したものである。本実験は、図8Aに関して上記したものと同様の方法で実施した（そして結果をプロット化した）。

図8A-8Cに示した結果は、最高用量での異なるRA-NR-AN-01接合体間のわずかな差を示すが、しかし低用量では、2' 及び13' RA-NR-AN-01は長時間（即ち48時間）標的細胞（即ちB054及びA375）又は非標的細胞（即ちHT29）代謝活性を有意に阻害しなかつ

た。したがって結果は標的細胞タンパク質合成の短時間阻害（上記図7C-7D）はMTT検定で測定されるように細胞に長時間代謝効果を引き起こさないことを示唆する。これらの検定が5分間曝露に起因する細胞の代謝変化を検出できたということは、遊離ロリジンAを用いて得られた結果により立証される。この場合、遊離ロリジンAは、細胞を5分間だけ薬剤に曝露したのちに48時間回復期間の間培養に戻した場合でさえ、標的及び非標的細胞型に対して非特異的阻害性を示した（図8A-8C）。

したがって、遊離ロリジンAに関する所見は、MTT検定が5分間曝露中に引き起こされた代謝変化を検出出来たことを示唆する。これらの所見を合わせて考え

ると、“パルス”処理で投与した場合はRA-NR-AN-01接合体は標的細胞活性（即ちタンパク質合成）を特異的に阻害しうる、そしてこれらの効果は可逆的でタンパク質合成又は細胞代謝活性に及ぼす有意の長時間効果を伴わない（MTT検定で測定されるように）ことが示唆される。RA-NR-AN-01抱合体のこれらの *in vitro* 特性は、*in vivo* 平滑筋細胞活性の阻害に非常に有用であると判断された。したがって次に動物モデル試験を実施して *in vivo* のこれらの治療用接合体の効果を評価した。

実施例 6

動物モデルにおける注入条件の確定

本発明の治療用接合体は外傷又は疾病後の狭窄を阻止するのに有用である。実施例では、血管形成術を実施するために用いたカテーテルを除去し、血管中にバルーン注入カテーテルを挿入することにより、血管形成術中に引き起こされる血管性外傷を外科手術中に処置する。注入カテーテルを血管の外傷領域に点滴注入口（あるいは浸透膜領域）を付けて配置し、圧力を掛けて治療用接合体を導入する。例えば、2個のバルーン付き注入カテーテルを用いて、1個のバ

ルーンを外傷部位のどちらかの側で膨らませて、治療用接合体を含有する適切な注入液が充填され得る液体間隙を作る。300mmHgの圧力で45秒間イヌ又はヒト冠動脈にセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）マーカー酵素を注入すると血管壁中にHRPが浸透するということが過去に報告されている（6）。しかしながら、HRPはNR-AN-01より小さい分子であり、ヒト及びイヌ冠動脈も家畜ブタモデル系における頸動脈又は大腿動脈よりかなり小さい。したがって、家畜ブタモデル系において、頸動脈及び大腿動脈の血管平滑筋さあ簿底の治療用抱合体の供給に適した注入条件を確定するための実験を実施した。血管壁中への治療用接合体の浸透、及び治療用接合体と血管壁の血管平滑筋細胞との特異的結合を評価することにより供給条件をモニタリングした。

注入カテーテルを用いて、家畜ブタ又は非ヒト霊長類の冠動脈及び大腿動脈に0.4気圧（300mmHg）－3気圧の範囲の多数の圧力で45秒間－3分間NR-AN-01を注入した。注入後、血管に滅菌食塩水をどっと流して、血管壁中のNR-AN-01マ

ウスIgGを検出するためにHRP抱合ヤギ抗マウスIgGを用いて免疫組織化学的に調製した。3分後に3気圧の圧力でこれらの血管壁中へのNR-AN-01の完全浸透が達成されることが確定された。

さらに免疫組織学を用いて、動物モデル系がNR-AN-01に対する標的抗原を発現することを確定した。容易に入手出来る実験動物種からの血管組織切片をNR-AN-01に曝露し、洗浄して、HRP抱合ヤギ抗マウスIgGと反応させた。非ヒト霊長類及びブタのみはヒトと250kD NR-AN-01標的抗原を共有することが判明した。

NR-AN-01が特異的方法でその標的抗原とin vivoに結合し得るかを調べるために、注入カテーテルを用いて家畜ブタの冠動脈及び大腿動脈に治療用抱合体を注入し、注入部位を滅菌食塩水で洗

い流して、次に手術部位を閉じて、動物をさらに3-5日間保持した。この期間の終了時に、血管注入部位を切り開き、再びヤギ抗マウスIgGを用いて免疫組織化学的に調製してNR-AN-01を同定した。NR-AN-01は、手術後3-5日目にブタ冠動脈及び大腿動脈の血管壁中で同定され、血管平滑筋細胞とだけ会合すると考えられた。これらの所見は、NR-AN-01がin vivoでその標的抗原と特異的に結合し得ることを示唆する。

実施例 7

in vivoの血管平滑筋細胞の阻害

バルーンカテーテル誘発性外傷に派生する血管内膜平滑筋増殖は、血管形成術後の再狭窄を含めた血管性外傷によるin vivoの平滑筋細胞活性の阻害に対する接合体の治療効力を評価するための良いモデルである。家畜ブタを用いてNR-AN-01（即ち血管平滑筋結合タンパク質又はこれらの試験においては単にVSMBPと呼ぶ；そしてロリジンAを伴う治療用接合体をVSMBP-RAと呼ぶ）の効果を試験した。一般にブタ動脈におけるバルーン血管形成術に派生する出来事は以前に記載されている（12）。これらの試験では、特大バルーン（およそ1.5：1のバルーン：動脈比）を用いた頸動脈の拡張は、長さ1.5-2センチの領域の完全内皮剥出を引き起こした。血栓を最小にしようとしてこの長さの外傷性損傷を選択したか、しかし依然として顕著な血小板沈着及び血栓形成が認められた。本手法は

さらに、内弾性膜を通して動脈中膜への切開並びに中膜平滑筋細胞の壊死を引き起こした。平滑筋増殖による内膜肥厚は損傷後7日目に現れ、14日目に85mmの平均最大厚に達した。この新生内膜はヒト再狭窄の増殖性新生内膜組織に非常によく似ている(13)。

NR-AN-01-ロリジンA接合体を用いて家畜ブタで一回投与試験プロトコールを実施した。カテーテルを介して一時的スリッ結紮

により局限される外傷化血管の領域中への被験接合体の局所投与を意図して、標的平滑筋細胞に高レベル曝露を提供する一方で全身性毒性を低減した。動物モデルにおける投与のこの動脈内経路はヒト冠動脈で提唱される経路をシミュレートする。試験プロトコールは、小動脈内、部位特異的、カテーテル投与性、血管平滑筋結合タンパク質(VSMBP)接合体の初期in vivoスクリーニングとして意図した。さらに小動脈平滑筋細胞に及ぼす病理生物学的作用に関して、遊離薬剤の毒性を評価した。実施例7に記載されているように、ロリジンA-NR-AN-01抱合体の治療的有效用量をin vitro試験で確定し、遊離Mab及びMab抱合体を動物に投与することにより適切な小動脈内投与圧力を調べた。

乳離れしたばかりの体重約30ポンドの肥育用ブタである6頭の家畜雑種ブタ(Duroc X)を実験に用いた。動物を無作為に以下の処理レジメンに割り当てたが、この場合、各ブタは右及び左の頸及び大腿動脈で分けられた4つの異なる処置を受け、このうち1つはPBS対照である(下表1-3)。

表 1

群 番 号

処 理 群物 質 説 明

1	対照、VSMBP	VSMBP, 200 μ g/ml, pH6.5 (PBS中)
2	対照、PBS	PBS, pH6.5 (注射滅菌水中)
3	対照、薬剤	リジンA, 2.5 μ g/ml (PBS), pH6.5
4	試験、接合体	VSMBP-RA2' (200 μ g/ml VSMBP & 2.5 μ g/ml RA)
5	試験、接合体	VSMBP-RA13' (200 μ g/ml VSMBP & 3.1 μ g/ml RA)
6	試験、接合体+RA	VSMBP-RA2' (200 μ g/ml VSMBP & 2.5 μ g/ml RA)+遊離ロリジンA (2.5 μ g/ml)
7	試験、接合体+RA	VSMBP-RA13' (200 μ g/ml VSMBP & 3.1 μ g/ml RA)+遊離ロリジンA (2.5 μ g/ml)

外科的手法：

被験接合体及び対照化合物を1回動脈内注入として、バルーンカテーテルにより引き起こされた内皮裸出及び外傷部位に投与した。わずかに抵抗を生じるように食塩水で十分に膨張させたサイズ3（

大腿）及びサイズ4（頸）Uresil Vascu-Flo® シリコーン閉塞バルーンカテーテル（Uresil Technology Center, Skokie, 11）を管内を23cmの長さ

通過させて内皮を1-2cmに亘って剥離させた。この技法により動脈がわずかに膨張した。この処理後、近位及び遠位スリップ結紮(3-0絹糸)を剥離領域末端近くに施して、Inflat

ion Pro[®] (USCI, C. R. Bard, Inc., Billerica, MA) 圧力注射器に取り付けたサイズ8のFrench, Infant Feeding Catheter (Cutter Resiflex, Berkeley, CA) を用いて被験接合体及び対照化合物を3気圧で3分間、裸出セグメントに直接投与した。3分間曝露期間後にスリップ結紮を取り外して、動脈血流が再び流れるようにした。これらの試験では、処理領域で加圧注入を達成する必要がある場合には、大腿又は頸動脈の枝を00絹縫合糸で結紮した。大腿動脈の最大遠位枝(伏在動脈)を切開して、カテーテル用入口部位として用いて、その後カテーテルを主大腿動脈中に通した。主大腿動脈でのこのカテーテル処理操作後、二次枝を結紮した。これらの場合、結紮及び切開を施してカテーテルを中に入れ、その後開口部を5-0モノシラメンポリブテステル (Novafil, D & G Monofil Inc., Monati, PR) で3-4針縫合して閉じた。

追跡調査法:

手術後、ブタは隔離及び手術回復期間中は3×5フィートのセメント床室内囲い場内で飼育した。その後、5週間治療期間の残りを過ごさせるために動物を室内/室外囲いに移した後に、組織学的検査用組織を収集した。

動物は手術から正常に回復し、手術部位の出血又は炎症は認められなかった。処理後5-6日目に、ドップラー聴診器で6頭すべてを検査し、各動物の全動脈を開存させた。処理後、全動物が正常な食欲、活動性及び体重増加を示した。

肉眼的病理学及び組織学的評価:

動脈の外傷化及び処理後5週目に、筋注により体重30ポンド当たり0.6mlのテラゾール Telazol[®] (塩酸チレタミン; A. H. Robins Co., Richmond, VA) 及び0.5mlのキシラジン (Lloyd Laboratories, Shenandoah, IA) で鎮静させて、ヘパリンを加え(ナトリウムヘパリン2mlを静注、1000単位/ml)、静注パントバルビタールにより安楽死させた。左右の頸及び大腿動脈を、処理セグメントに近位及び遠位のものが含まれる正常血管とともに取り出し

た。動脈を測定し、結紮及び肉眼的異常の位置に留意した。動脈を2mm間隔で横断し、O.C.T (最適切断温度) 化合物 (Tissue Tak®, Miles Laboratories Inc., Elkhart, IN) 付クリオモルドに順に並べ、液体窒素中で凍結させた。形態学的試験用に、ブロックを5 μ に切断して、H&E、マッソントリクロームMassons Trichrome及びモバトペンタクロームMovats Pentachromeで染色した。切片はさらに血管平滑筋の免疫組織学的染色に用いた。

動脈の段階切片の組織学的検査から、外傷を施し、RA-NR-AN-01接合体処理した領域における内膜平滑筋増殖の顕著な阻害が明示された(表2)。血管の亜肉眼的評価でさえも、この阻害は明らかであった。内膜平滑筋細胞増殖の阻害には、血管壁の平滑筋細胞死の組織学的証拠は最小度に認められるか、あるいは全く認められなかった。このような外傷化動脈の横断面を図9A及び9Bに示す。

表 2

外傷化及び処理ブタ動脈における内膜平滑筋増殖

処理	評価動脈番号	内膜SMC 肥厚* 平均 (範囲)
対照、MAB	4	3.75 (3 4)
対照、PBS	4	4 (4)
対照、RA	2	4 (4)
試験、2' RA		
(高圧)	1	1 (1)
(低圧)	1	3 (3)
試験、13' RA		
(高圧)	1	1 (1)
(低圧)	1	1 (1)

*内膜SMC 肥厚: 1+ (最小) から 4+ (最大) までの尺度で採点した内膜平滑筋細胞肥厚。

図9Aに示した結果は、血管形成術後5週間目の未処理動脈の横断面(倍率160倍)を示す。動脈の主な組織学的特徴としては、内弾性膜(図9Aの#2)から離れて内皮(図9Aの#1)が転位しているのが挙げられるが、これは明らか

に内膜平滑筋増殖（図9Aの#3）に依るものである。

図9Bに示した結果は、血管形成術及びRA-NR-AN-01治療用抱合体注入後5週間目の処理動脈の横断面（倍率160倍）を示す。この切片の血管には図9Aに示した血管よりも大きな機械的ストレスを加えたが、多数の部位で外弾性膜が破裂し、中膜外層にそれに関連した平滑筋細胞の増殖が観察された（図9Bの#4）。治療用抱合体で処理すると内膜肥厚阻害され、これは内弾性膜（図9Bの#2）から内皮（図9Bの#1）が転位していないことで立証される

。意外にも、平滑筋細胞に及ぼすこの阻害効果は、外弾性膜（図9Bの#4）が破裂した領域の中膜平滑筋細胞の肥厚を伴わずに達成された。

これは非常に幸運な結果であって、というのも傷の治療が内膜肥厚及び再狭窄、又は中膜の平滑筋細胞の壊死といった悪い結果を伴わずに処理血管中で進行するからである。

これらの組織学的試験においてさらに2'及び13'ーロリジンA抱合体の有効性を比較した結果、13'抱合体（即ち13' RA-HS-NR-AN-01）は平滑筋細胞の内膜肥厚を阻止するに際して2'抱合体（即ち2' RA-HS NR-AN-01）よりも活性であると考えられるという所見を得た。この試験においては、13'抱合体の低圧注入は高圧よりも有効に平滑筋増殖を阻害し、そして13'抱合体はさらに2'接合体よりも有効であると思われた。

図9Bにおいて、血管形成術後の部位に治療用抱合体を投与すると、未処理血管の管腔を狭くする平滑筋肥厚の約95%阻害を生じた（図9A）。有意に、治療用抱合体は平滑筋細胞に及ぼすその効力を発揮して中膜平滑筋層から内膜中に移動し、内皮に影響を及ぼさずあるいは動脈壁の中膜層の平滑筋細胞の壊死（即ち細胞死）のいかなる徴候も生じなかった。試験はさらに、血管壁に及ぼす毒性作用に起因するような単核球浸潤又は繊維症のいかなる組織学的徴候も示さなかった。さらに処理血管の内膜層に治癒の明らかな徴候が観察され、内皮の再生長が観察され、つまり内皮細胞が内皮と内弾性膜（図9Bの#1及び#2）との間にある内膜中の平滑筋の薄層全体を覆って増殖した。これらの組織学的観察を合わせると、血管の内膜層における平滑筋過形成を阻止する治療用抱合体による処理

後の傷治癒、内皮の再生長及び血管強度の改良についての非常に望ましい特徴が示唆される。

実施例 8

血管平滑筋細胞in vitro DNA及びタンパク質合成阻害

血管平滑筋細胞におけるDNA合成及びタンパク質合成を阻害する種々の治療薬の能力を調べた。³H-ロイシン及び³H-チミジン取り込み並びに細胞毒性検定を以下のプロトコルに従って実施した。

5分間曝露；³H-ロイシン取込み：40,000細胞/mlの血管平滑筋細胞を滅菌24ウェルプレート中に1ml/ウェルで植え付けた。湿潤大気（飽和）中に5% CO₂、95%空気で37°Cでプレートを一夜インキュベートした。問題の治療薬の対数希釈液を5分間又は24時間、血管平滑筋細胞とともにインキュベートした。治療薬の試料を、5%ウシ胎児血清（FBS, Gibco BRL, Gaithersburg, MD）及び5%血清プラスSerum Plus®（JRH Biosciences, Lenexa, KS）を

含有するDMEM：F-12培地中で希釈した。治療薬インキュベーション

後、溶液を吸引し、5%血清プラスSerum Plus®を含有するロイシン無含有DMEM（Dulbeccoの修正イーグル培地）に溶解した0.5マイクロキュリ-1/mlの³H-ロイシン1ml/ウェルを加えた。湿潤大気中5%CO₂で37°Cで一夜、プレートを再インキュベートした。スコアリング尺度を用いる倒立顕微鏡を用いて細胞を視覚的に等級分けして、生存度及び細胞数を確定した。等級1-3は、対照ウェルと比較した細胞の生存度及び数のパーセントを基礎にし、3=100%、2=70%-100%及び1=0%-70%であった。このスコアリングの記録は治療薬の直接細胞毒作用を確定するのに手助けとなった。次に培地を吸引し、細胞を冷5%TCAで2回洗浄した。ウェル当たり400μlの0.2M NaOHを加え、プレートを回転操作台上で室温で2時間インキュベートした。200μl/ウェルの細胞溶液をプラスチック製シンチレーションバイアル（Bio-Rad Laboratories

）中に移して、4 mlのBio-Safe® II液体シンチレーション液（Research Products InterCorp., Mount Prospect, IL）を加えたのちに攪拌した。Lotus 1-2-3® ファイルへの変換及びLotus 1-2-3® を用いた分析のためにBeckman "Data Capture"ソフトウェアとインターフェースで接続するBeckman LS2800液体シンチレーション計数計でバイアルを計数した。

5分間曝露；³H-チミジン取込み：血管平滑筋細胞を滅菌24ウエルプレート中の湿潤5%CO₂環境で37℃で一夜、5%FBS（Gibco）を含む完全培地中でインキュベートした。培地をウエルから吸引し、成長因子（DMEM：インシュリン（5 μg/ml）、トランスフェリン（5 μg/ml）及びナトリウムセテナイト（5 ng/ml）（Sigma Chemical, St. Louis, Missouriから購入）を含有する成長因子カクテル（カタログ番号I1884）を補充したF-12基礎培地）を補充した血清無含有培地を加えた。細胞をこの培地中で24時間インキュベートした。5分間治療薬曝露のために、治療薬の対数希釈液を細胞とともに完全培地中でインキュベートした。5分後に培地を吸引した後、完全培地中に分散された1.0マイクロキュリー/mlの³H-チミジン1 ml/ウエルを加えた。24時間曝露には完全培地中に分散された1.0マイクロキュリー/mlの³H-チミジン1 ml/ウエルとともに細胞をインキュベーションとすることが含まれており、治療薬の対数希釈液を試験した。両曝露試験においては、次に細胞を湿潤5%CO₂環境で37℃で一夜インキュベートした。細胞を生存度及び細胞数に関して視覚的に評価した。細胞を洗浄し、³H-ロイシンプロトコールに関して記載したようにプラスチック製シンチレーション

バイアルに移すために調製した。Lotus 1-2-3® ファイルへの変換及びLotus 1-2-3® を用いた分析のためにBeckman "Data Capture"ソフトウェアとインターフェースで接続するBeckmanL

S 2800液体シンチレーション計数計でバイアルを計数した。

これらのプロトコールは、他の標的細胞集団、特に付着性単層細胞型にも用い得る。

形態学的細胞毒性評価—パルス曝露：

血管平滑筋細胞を 4.0×10^4 細胞/培地1ml/ウエルで、市販の4ウエルスライド(Nunc, Inc., Naperville, Illinois)上に植え付けた。2つのパルス曝露長(5分間及び24時間)に十分なスライドに植え付けられ、増分評価点(24時間及び128時間)が規定された。スライドは全て2通り試験してあらゆる検定異常を明示した。 ^3H -ロイシン及び ^3H -チミジン検定に用いたのと同じ培地中に本治療薬を希釈した。各4ウエルスライドは、上記の ^3H -ロイシン及び ^3H -チミジン検定により確定されたように、最小有効濃度(ウエル“C”)より高い一対数濃度(ウエル“B”)、より低い一対数濃度(ウエル“D”)に一まとめにした濃度であった。正常形態に関する対照として、あるウエル(ウエル“A”)を未処理(培地のみ)のままにした。インキュベーションは、 37°C 、5% CO_2 湿潤インキュベーター中で実施した。各2(5分間及び24時間)曝露点後、治療薬培地を各ウエル(未処理ウエルを含む)から吸引した。次いで新鮮な培地1mlを加えて吸引培地と取り換えた。各増分評価点に届くまで、再インキュベーションを続けた。これらの時点で、培地を吸引して、次いで10%中性緩衝ホルマリン1mlに取り換えて1時間置いて、適正に固定させた。これらの固定スライドをヘマトキシリン(核)及びエオシン(細胞質)で染色して、形態学的評価及び等級分けをおこなった。

結果：24時間 ^3H -ロイシンタンパク質阻害検定及び24時間 ^3H -チミジンDNA合成阻害検定の結果を、スラミン、スタウロスポリン、ニトログリセリン及びサイトカラシンBに関してそれぞれ図10

A-10Dに示す。被験化合物はすべて、利用可能な治療範囲(^3H -ロイシン検定の曲線下の面積は ^3H -チミジン検定のものより大きい)を明示し、このことは本発明の持続性放出投与形態態様の実施に際して有用であることを示す。さらに、本化合物は血管平滑筋細胞のタンパク質合成を阻害するよりも大きく5%FB Sの存在下でDNA合成を行う血管平滑筋細胞の能力を阻害した。5分間及び24時間パルス曝露中のスラミン、スタウロスポリン、ニトログリセリン及びサイトカラシンBのタンパク質及びDNA合成阻害効果を、図10A-Dにそれぞれ示す。

実施例9

血管平滑筋細胞による標的化粒子の特異的結合及びインターナリゼーション

結合タンパク質又はペプチドで被覆された粒子を結合し、インターナライズする血管平滑筋細胞の能力を、モノクローナル抗体 (NR-AN-01) 被覆金ビーズを用いて *in vitro* 及び *in vivo* の両方で立証した。血管平滑筋細胞組織培養 (B054)、抗原陽性対照細胞株 (A375) 及び抗原陰性対照細胞株 (HT29) を10nmの金ビーズとともに、NR-AN-01で被覆した一群及び二次非被覆対照群を用いてインキュベートした。細胞を単層及び細胞懸濁培養としてビーズに曝露し、電子顕微鏡により結合及びインターナリゼーションに関して6つの時点 (即ち1分、5分、15分、30分、60分及び24時間) で調べた。

表3は、細胞表面との結合が特異的であることを示す実験の結果を示す。表3で用いた相対的等級システムは、粒子結合の主観的評価を表し、0=なし；1=最小度；2=軽度；3=中等度；4=顕著である。粒子の集合体が平滑筋細胞及び対照細胞の両方の単層表面上に積もった場合、粒子はマクロ及びミクロ食作用により非特異

的にインターナライズされた。細胞を懸濁液中に保持した場合、非特異的インターナリゼーションは最小度であるか又は認められなかった。HT29細胞により産生された表面ムチンへのNR-AN-01を欠く金ビーズの非特異的付着が観察され、その適度の非特異的インターナリゼーションが生じた。NR-AN-01標的化金ビーズの血管平滑筋細胞取込みは、細胞懸濁培養において非常に特異的であった。

表 3

時 間	グリッド	生成物	細胞株	細胞表面	一次小胞 マクロ/ ミクロ食 作用ピノ サイトー シス	被 覆 ビット	二次 小胞	リソ ソーム	ゴルジ	滑面 小胞 体
Cell Monolayer										
1 分	Aa	05(G)	A375	2	0	0	0	0	0	0
	Ba	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	C	05(G)	B054	2	1	0	0	0	0	0
	Da	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Eb	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	F	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
5 分	Ac	05(G)	A375	4	1	0	0	0	0	0
	Bb	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Ca	05(G)	B054	3	0	0	0	0	0	0
	Dc	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Ea	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Fa	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
15 分	Aa	05(G)	A375	3	1	0	0	0	0	0
	Bb	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Ca	05(G)	B054	2	1	0	0	0	0	0
	Da	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	Ea	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Fa	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
30 分	A	05(G)	A375	4	3	0	2	0	0	0
	B	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	C	05(G)	B054	3	2	0	1	0	0	0
	D	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	E	(G)	HT29	0	1	0	0	0	0	0
	F	(G)	B054	1	1	0	0	0	0	0
60	Aa	05(G)	A375	4	3	2	3	2	0	1
	Ba	05(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	Cc	05(G)	B054	3	2	0	2	0	0	1
	Da	(G)	A375	0	1	0	0	0	0	1
	Ec	(G)	HT29	1	1	0	1	0	0	0
	Fa	(G)	B054	1	2	0	1	0	0	0
24時間	Ab	05(G)	A375	2	1	1	2	4	0	2
	Ba	05(G)	HT29	0	1	1	2	3	0	0
	Cc	05(G)	B054	3	3	1	3	4	1	1

表 3 (続き)

時 間	グリ ッド	生成物	細胞株	細胞 表面	一次小胞 マクロ/ ミクロ食 作用ピノ サイトー シス	被 覆 ビット	二次 小胞	リン ソーム	ゴルジ	滑面 小胞 体
	Da	(G)	A375	0	3	0	2	3	0	0
	Eb	(G)	HT29	0	3	0	3	1	0	0
	Fb	(G)	B054	0	2	0	2	3	0	0
細胞ペレット										
1 分	1A	05 (G)	A375	2	0	0	0	0	0	0
	7A	05 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	13A	05 (G)	B054	3	0	1	0	0	0	0
	1B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	7B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
5 分	13B	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
	2A	05 (G)	A375	3	1	0	0	0	0	0
	8A	05 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	14A	05 (G)	B054	2	1	0	0	0	0	0
	2B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
15 分	8B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15B	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
	3A	05 (G)	A375	4	1	0	1	0	0	0
	9A	05 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15A	05 (G)	B054	1	1	0	0	0	0	0
30 分	3B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	9B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	15B	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
	4A	05 (G)	A375	4	2	0	0	0	0	0
	10A	05 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
60 分	16A	05 (G)	B054	2	1	0	0	0	0	0
	4B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	10B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	16G	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
	5A	05 (G)	A375	3	3	0	2	1	0	0
24時間	11A	05 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	17A	05 (G)	B054	2	2	0	2	0	0	0
	5B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	11B	(G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	17B	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0
24時間	6A	05 (G)	A375	3	1	0	3	3	0	0

表 3 (続き)

時 間	グリッド	生成物	細胞株	細胞表面	一次小胞 マクロ/ ミクロ食 作用ピノ サイトー シス	被 覆 ビット	二次 小胞	リソ ソーム	ゴルジ	滑面 小胞 体
	12A	O5 (G)	HT29	0	0	0	0	0	0	0
	18A	O5 (G)	B054	2	1	0	1	3	0	0
	6B	(G)	A375	0	0	0	0	0	0	0
	12B	(G)	HT29	1	2	0	2	2	0	0
	18B	(G)	B054	0	0	0	0	0	0	0

図11は、細胞にインターナライズされる過程でそのいくつかが抗体被覆金ビーズを含有する多数のエンドサイトーシス性小胞を特徴とする平滑筋細胞の内表面に平行な接線切片を示す。細胞表面抗原に付着する粒子を伴うこれらのエンドサイトーシス性小胞を刺激して、正常細胞表面膜再循環に関して予測されるよりも高い比率でリソソームと融合させた。インターナライズ粒子のその結果生じる顕著な蓄積が24時間時点で観察されたが、それを図12に示す。

標的化金ビーズ血管平滑筋細胞表面結合、インターナライゼーション及びリソソーム濃縮はin vivoでも同様に観察された。バルーン外傷直後にブタ大腿動脈の壁中に3気圧で3分間適用されるスリップ結紮で近位及び遠位で閉塞された処理領域により開放端化された血管内カテーテルを介してNR-AN-01被覆金ビーズを注入した。ビーズインターナライゼーション速度は、バルーン外傷中に血管平滑筋細胞が蒙る損傷の程度によって変化した。最小度の損傷を有するか又は全く損傷がない細胞はエンドサイトーシス及び食作用により粒子を迅速にインターナライズして、リソソーム中でインターナライズ粒子を濃縮した。外傷により殺された細胞は、表面ビーズ結合を示した。外傷による損傷は受けたが生き残った細胞は、インターナ

ライゼーション及びリソソーム濃縮の遅延を伴うビーズ表面結合を特徴とした。図13は、ビーズ投与後1週間目のin vivoのリソソーム中の粒子濃縮を示す。

実施例10

スタウロスポリン及びサイトカラシンによる血管平滑筋in vitro DNA及びタン

バク質合成阻害

血管平滑筋細胞における *in vitro* DNA 及びタンパク質合成を阻害するスタウロsporin 及びサイトカラシンの能力を試験した。以下のプロトコールに従って、 ^3H -ロイシン及び ^3H -チミジン取込み並びに細胞毒性検定を実施した。

培養化細胞：

大動脈ヒ平滑筋細胞の外植片からB054細胞（ヒ平滑筋細胞）を得た。細胞を5%ウシ胎児血清（FBS, Gibco）及び5%Serum P
lus[®]（JRH Biologicals）を含有するDMEM（Dulbeccoの修正イーグ

ル培地）：F-12培地（Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland）（“完全培地”）中に広げて、細胞の種一組を液体窒素中で凍結して継代7回での将来の使用に備えた。

5分間曝露；タンパク質合成検定：

血管平滑筋細胞を40,000-50,000細胞/mlで植え付けて、実施例8の“5分間曝露； ^3H -ロイシン取込み”に記載されているように処理した。スタウロsporinの対数希釈液（200ng/ml, 20ng/ml, 2ng/ml, 0.2ng/ml及び0.02ng/ml）を完全培地中に分散させた。サイトカラシンBに関しては、20ng/ml, 2ng/ml, 0.2ng/ml, 0.02ng/ml及び0.002ng/mlの対数希釈液を完全培地中に分散させた。次に完全培地を対照ウエルに加えた。1ml/ウエルの各治療薬希釈液を4通りのウエルに加え、問題の薬剤を血管平滑筋細胞とともに滅菌通風口付集風器中で室温で5分間インキュベートした

。治療薬インキュベーション後、ウエルを実施例8の“5分間曝露； ^3H -ロイシン取込み”に記載されているように処理した。

5分間曝露；DNA合成検定：

血管平滑筋（B054）細胞を植え付けて、上記の“5分間曝露；タンパク質合成検定”に記載されているように処理した。被験治療薬で5分間インキュベーション後、培地を吸引して、完全培地に分散させた1ml/ウエルの $1.0\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -チミジン（ ^3H -ロイシンでなく）を加えた。次に湿潤5%CO₂環境で37℃で一

夜、細胞をインキュベートした。次いで、上記のタンパク質合成検定に記載されているように、治療薬の毒性効力を確定した。

24及び120時間曝露；タンパク質合成検定：

血管平滑筋 (B054) 細胞を20,000細胞/mlで滅菌24ウエルプレートに植え付けて、湿潤大気(飽和)中5%CO₂、95%空気中で37℃で一夜、完全培地(1ml/ウエル)中でインキュベートした。スタウロsporinの対数希釈液(100ng/ml, 10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml及び0.01ng/ml)を、次いで下記のように2つの培地中に分散させた。サイトカラシンBに関しては、10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0.01ng/ml及び0.001ng/mlの対数希釈液を下記のように2つの培地中に分散させた：

培地(1) - 完全培地；及び

培地(2) - DMEM (ロイシン無含有)。0.5 μ Ci/mlの³H-ロイシンを含む。

培地(2)は、実験の最終24時間インキュベーション期間に用いる。

さらに、24時間検定において、各治療薬を上記のように培地(2)中で希釈した。ウエルから培地(1)を吸引し、培地(2)中の治療薬希釈液のアリコート適切なウエルに4通りに加えた。次いで培地(2)を対照ウエルに加えた。

120時間検定では、上記のように各治療薬を培地(1)に希釈した。培地(1)をウエルから吸引し、培地(1)中の治療薬希釈液のアリコートを適切なウエルに4通りに加えた。次いで培地(1)を対照ウエルに加えた。培地を24時間毎に取り換えて、新鮮な治療薬を被験ウエルに加えた。96時間目(即ち4日目)に、上記のように、各治療薬を培地(2)で希釈した。培地(1)をウエルから吸引し、培地(2)中の治療薬希釈液のアリコートを適切なウエルに4通りに加えた。次いで培地(2)を対照ウエルに加えた。

³H-ロイシン(及び対照)中の被験薬剤を湿潤大気中5%CO₂で37度Cで一夜インキュベートした。次いで上記の5分間曝露；タンパク質合成検定に記載されているように、治療薬の毒性効力を測定した。さらに、各希釈での細胞の変化をツァイスZeiss顕微鏡(Zeiss, West Germany)を用いて320倍で写真撮影した。次に培地を吸引して、上記のように細胞をTCAで処理した。

24及び120時間曝露；DNA合成検定：

“24及び120時間曝露；タンパク質合成検定”に関して記載された手順にしたがって本発明を実施したが、但し本24及び120時間DNA合成検定における培地（2）は：

培地（2）＝完全培地。 $1.0\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H -チミジンを含む。培地（2）は、実験の最終24時間インキュベーション期間に用いる。

これらのタンパク質及びDNA合成検定は、他の標的細胞集団、特に付着性単層細胞型にも用いる。

結果： 培地のみで処理した対照のパーセンテージとして、各薬剤の最小有効用量（MED）を確定した；対照の50％値を細胞毒性基準として選択した。5分間曝露で、スタウロスポリンはタンパク質合成検定では $100\text{ng}/\text{ml}$ 、DNA検定では $1\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを立証した。

スタウロスポリンに関する24時間MEDはタンパク質合成検定では $10\text{ng}/\text{ml}$ 、DNA合成検定では $1\text{ng}/\text{ml}$ であった。両検定は、スタウロスポリンの120時間曝露に関しては $1\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを示した。

5分間曝露で、サイトカラシンBはタンパク質合成検定ではDNA検定と同じく $10\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを立証した。サイトカラシンに関する24時間MEDはタンパク質合成検定では $1.0\text{ng}/\text{ml}$ 、DNA合成検定では $0.1\text{ng}/\text{ml}$ であった。両検定は、スタウロスポリンの120時間曝露に関しては約 $0.1\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを示した。

上記のサイトカラシンBに記載されたと同じ希釈液を用いて、サイトカラシンC及びサイトカラシンD治療薬を24時間及び48時間曝露で試験した。24時間で、サイトカラシンCはタンパク質合成検定では $1.0\text{ng}/\text{ml}$ 、DNA検定では $0.01\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを立証した。48時間では、サイトカラシンCはタンパク質合成検定では $0.1\text{ng}/\text{ml}$ 、DNA検定では $0.01\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを立証した。サイトカラシンDは、24時間タンパク質合成検定では $1.0\text{ng}/\text{ml}$ 、24時間DNA検定では $0.1\text{ng}/\text{ml}$ のMEDを立証した。サイトカラシンDへの48時間曝露は、タンパク質合成検定及びDNA検定の両方で $0.1\text{ng}/\text{ml}$ – $0.01\text{ng}/\text{ml}$ の範囲のMEDを示した。

実施例11

血管平滑筋細胞移動阻害

サイトカラシンBによる平滑筋細胞移動阻害の程度を確定するための引っ掻き検定を、以下のプロトコールに従って実施した：

実施例10に記載されているように、ヒヒ大動脈平滑筋の外植片から血管平滑筋細胞 (B054) を得た。細胞を約5mlの培地を入れた平底6 ウェル組織培養プレートで増殖させた。血管平滑筋細胞を200,000細胞/ウェルで平板培養して、湿潤5%CO₂ インキュベーター中に37℃で1時間置いた。次に片刃剃刀をクランプ又はプライヤー

で保持して、90度の角度でウェルの底に無菌的に接触させて、滅菌した部分でウェルを引っ掻いた。刃をウェルの底に接触させたままで、滅菌綿棒で引っ掻き部分に沿った小領域から細胞を取り出した。インキュベーション後、“引っ掻き”領域中の細胞の存在は、引っ掻き線を横切って細胞が移動したことを示す。対照インキュベーションは有意の細胞移動を示し、治療薬に曝露された細胞の移動を比較する基準として役立つ。

要するに、1mg/mlでジメチルスルホキシド (DMSO) 中に溶解したサイトカラシンR (Sigma Chemical Co.) のストック溶液を調製した。サイトカラシンB又は対照培地の被験希釈液を加えた。各実験には、下記の2組のプレートが含まれた：

A組： 1, 3, 6, 8及び10日間被験薬剤曝露のみ；

B組： 1, 3, 6, 8及び10日間被験薬剤曝露。その後対照培地で7日間の回復時間。

曝露終了時に、両組のプレートを固定し (PBSに溶解した10%ホルマリン)、染色 (0.02%クリスタルバイオレット) した。サイトカラシンBの試験濃度は、1, 0.1及び0.01 μ g/mlで、陰性培地対照も含まれた。新鮮な培地及び薬剤を週に3回供給した。

表4は、これらの実験の結果を示す。表中、“M”は移動等級を示し、ここでは引っ掻き部分に隣接した除去領域中への血管平滑筋細胞の、- = 移動なし；+1 = 最小度；+2 = 軽度；+3 = 中等度；+4 = 顕著 (最大密度：細胞接触阻害

の限界)な移動を示す。表中、“T”は、形態学的毒性等級を示し、ここでは、
 - = 毒性なし; +1 = 最小度; +2 = 軽度; +3 = 中等度; +4 = 顕著な毒性を示す。
 移動結果は、“ウエルの除去領域における等級/ウエルの非妨害領域における等級”
 として表される。毒性値は、各ウエル中の全細胞に関する等級を示す。

データは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の用量で引っ掻き部分に隣接する除去領域中への血管平滑筋細胞の移動(+1 - +2)をサイトカラシンBが阻止することを示し、最小(- - +1)形態学的毒性のみを示す。データはさらに、治療薬への10日間の連続曝露後でさえ、処理($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$)は治療薬除去後に移動する(+3 - +4)能力を再獲得することを示す。

表 4

引っ掻き-移動検定: サイトカラシンBによる血管平滑筋細胞移動の阻止

	連続曝露				曝露後7日間回復			
	用量 $\mu\text{g}/\text{mL}$				用量 $\mu\text{g}/\text{mL}$			
日	対照 0.0	0.01	0.1	1.0	対照 0.0	0.01	0.1	1.0
1 M	+1/+3	+1/+3	+1/+3	-/+2	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	-	+3	-	-	-	+2
3 M	+3/+4	+3/+4	+1/+4	-/+2	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+3	-	-	-	+1
6 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2	+4/+4	+4/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4	-	-	-	+3
8 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2	+4/+4	+4/+4	+3/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4	-	-	-	+3
10 M	+3/+4	+3/+4	+2/+4	-/+2	+4/+4	+4/+4	+4/+4	+2/+3
T	-	-	+1	+4	-	-	-	+3

実施例12

血管平滑筋細胞に及ぼす治療薬細胞毒性作用パルス及び連続曝露

血管平滑筋細胞を2つの曝露フォーマットのうちの1つで治療薬に曝露した：

パルス曝露：パルス曝露プロトコールは実施例8に記載されている（“形態学的細胞毒評価－パルス曝露”参照）。

連続曝露：パルス曝露と同様の方法を用いて連続曝露形態学的細胞毒性評価を行うが、但し試験ウエルは曝露期間中は培地中の治療薬に連続的に曝露される。培地及び治療薬を毎日対照ウエルを含めた各ウエルから吸引して、新鮮な培地及び治療薬（又は対照ウエルに関しては培地のみ）1mlに取り換えた。長時間連続曝露プロトコールの各増分評価時点に届くまで、再インキュベーションを続けた。これらの増分評価時点は、6、24、48、72、96、120、168、216及び264時間であった。指定時間に、適切な細胞を固定し、染色して、パルス曝露プロトコールの場合と同様に評価した。連続曝露実験の結果を、スラミン、スタウロsporin及びサイトカラシンBに関して表5に示す。表5に示した5分間及び24時間データは、図10A、10B及び10Cに含まれるデータと相関関係がある。

表 5
形態学的細胞毒性検定
薬物及用量

細胞プロトコール	サイトカラシンB			スラミン			スタウロスボリン		
	10ug	1ug	0.1ug	10ug	1ug	0.1mg	100ng	10ng	1ng
5分+2時間	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
5分+5時間	4	1	0	-	1	0	0	0	0
5分+24時間	4	0.5	0	-	1	0	0	0	0
5分+48時間	4	1	0	-	2	0	0	1	0
5分+72時間	4.5	1	0	-	3	1	0	3	1.5
5分+96時間	5	1	0	-	3	1	0	3.5	1.5
5分+120時間	5	1	0	-	3	1	0	4	1.5
連続0時間	-	3	0	0	3	1	0	0	0
連続24時間	-	3	1	0	3	2	0	0	0
24時間+24時間	-	3	0.5	0	4	3	0	0.5	0
24時間+48時間	-	4	1	0	4	3	0	2	0
24時間+72時間	-	4	0.5	0	4	3	0.5	1	0
24時間+96時間	-	4	0	0	4	3.5	1	1.5	0
24時間+120時間	-	4	0	0	4	3.5	1	1.5	0
連続24時間	-	3	0	0	-	1	1	3	1
連続48時間	-	3	1	0	-	3	2	3	2
連続72時間	-	3	1	0	-	4	3	3	2
連続96時間	-	3	2	0	-	4	3	3	2
連続120時間	-	3	1	0	-	5	4	3	2
連続168時間	-	4	1	0	-	5	4	3	2
連続216時間	-	4	1	0	-	5	4	3	2
連続264時間	-	4	1	0	-	5	4	4	2

In vitro有効用量で、サイトカラシンB (1 μ g/ml; 抗移動/収縮有効用量) 及びスタウロスボリン (1ng/ml; 抗増殖有効用量) はそれぞれ等級1 (最小度) 及び2 (軽度) の細胞毒性を示した。個々の試験は、本発明の細胞増殖抑制性抗増殖剤に関しては等級3 (中等度) 又はそれ以下の等級が好ましいことを示した。

実施例13

In vivo薬剤検定：血管平滑筋細胞増殖の阻害

薬剤検定：細胞DNA合成及び増殖中の塩基類似体 5-ブプロモ-2'-デオキシウリジン (BRDU, Sigma Chemical Co. から購入) のDNAへの取り込みを測定することにより、in vivo血管平滑筋増殖を定量した。市販の抗BRDUモノクローナル抗体を組織化学的に用いて、BRDU取込みを立証した。1時間パルス標識によりパルス期間に分裂中の細胞の数を査定できる。

上記のBRDUパルス標識プロトコールをin vivoブタ血管試験に関する標準評価法として用いる。手術及び処理操作（例えば本明細書の実施例7及び11で考察）並びに術後回復期間後、ブタを鎮静化し、BRDUでパルス処理して1時間後に組織を収集した。

要するに、筋注により塩酸チレタミン及びキシラジン（実施例7の“肉眼的病理学及び組織学的評価”と同様）を用いてブタを鎮静させた。次にBRDUを外側耳静脈を介して静注投与した。50mg/mlの濃度のBRDU 2mlを体重30-40ポンドの各ブタに投与した。1時間後、ペントバルビタールを静注してブタを屠殺した。次いで試験動脈セグメントを取り出した（セグメントは、処理動脈セグメントに関して近位に、そして可能な場合には遠位に位置する正常血管を含んだ）。動脈セグメントを2mm間隔で横断し、O.C.T.（最適切断温度）化合物（Tissue Tek[®], Miles Laboratories, Inc., Elkhart, I

N）を有する凍結型cryomoldsに順に並べて、液体窒素中で凍結させ

た。ブロックを5ミクロンの切片にして、免疫組織学的染色をし、以下の手法を用いてBRDUを検出した。

BRDU標識化細胞検出：

BRDU（1g BRDUを滅菌水17ml及び1N NaOH 3ml中に希釈）パルス標識並びに試験動脈セグメント除去及び切片作製（上記）後、抗BRDUモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色により、特異化期間中の有糸分裂指数を測定する視覚的手段が提供される。免疫組織学的染色は以下のように実施した：

- 1) 被験動脈の5 μ m切片を冷アセトン (-20℃) で10分間脱水した;
- 2) 切片をガラス顕微鏡スライド上に載せて、スライドを37℃で10分間乾燥させた;
- 3) スライドをPBS中で10分間、再脱水した;
- 4) 1 N HClを用いてスライドにホルゲン酸加水分解を施す。この場合、処理前に1 N HClの2つのアリコートに37℃及び60℃に予熱する;
- 5) スライドを37℃で1分間、1 mlの1 N HClで洗浄した;
- 6) スライドを60℃の1 N HClに15分間移した;
- 7) スライドを37℃で1分間、1 mlの1 N HClで洗浄した;
- 8) スライドを室温PBSで洗浄した。PBSは5分間隔で3回換えた;
- 9) 切片上の内因性交差反応部位を正常ヤギ血清 (PBS中1:25) で20分間遮断した;
- 10) 工程8と同様に、スライドをPBSで洗浄した;
- 11) 切片をマウス抗BRDU抗体 (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) とともに10 μ g/mlで30分間インキュベートした;
- 12) 工程8と同様に、スライドをPBSで洗浄した;
- 13) 切片をセイヨウワサビペルオキシダーゼ標識化 (HRP0) ヤギ抗マウスIgG₁ (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA; PBSで1:20に希釈) 及び4%ヒトAB血清とともに30分間インキュベートした;
- 14) 工程8と同様に、スライドをPBSで洗浄した;
- 15) 切片を色素原 (3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB; Sigma), 200ml PBS中に5 mg/ml) 及び200 μ lの30% H₂O₂とともに10分間インキュベートした;
- 16) 工程8と同様に、スライドをPBSで洗浄した;
- 17) 試料をGill Iヘマトキシリン (Gill I Lerner Laboratories, Pittsburgh, PA; 30ディップ) で対比染色した;
- 18) 工程8と同様に、スライドをPBSで洗浄した; 青み溶液 (dH₂O 500ml中に炭酸リチウム 1gm) で濯ぎ; 脱イオン水で洗浄した; そして
- 19) 被験試料を脱水し、浄化して、カバーガラスをかけた。

この手順の終了時に、陽性免疫組織学的染色は反応性の部位で褐色を示す。

殺細胞剤は、PBS対照に関してBRDU取込みを阻害した；しかしながら、サイトカラシンB及びスタウロスポリンは、血管平滑筋細胞を殺さずにBRDU取込み（即ち細胞増殖）を阻害した。BRDUで標識された血管平滑筋細胞の数を、以下のよう
に400倍の倍率での等級に割り当てた：

1 = ≤ 1 / 高パワー領域 (HPF) ；

2 = 2 - 5 / HPF ；

3 = $> 5 - \leq 10$ / HPF ；及び

4 = > 10 / HPF。

サイトカラシンB及びスタウロスポリンはともにバルーン外傷後

24時間増殖を阻害し（等級1）、外傷前基準（等級1）と同じBRDU標識等級を生じた。PBS及びモノクローナル抗体対照は、同一期間に等級2.5 - 4のBRDU標識を示した。外傷後4日目に、サイトカラシンB又はスタウロスポリンで処理した動脈、並びにPBS及びモノクローナル抗体対照は、BRDU標識等級4を示した。サイトカラシンB及びスタウロスポリンの抗増殖非殺細胞特性は、これらの薬剤が血管狭窄の低減のための持続性放出投与処方物たり得ることを示唆する。

実施例14

サイトカラシンBを用いたバルーン外傷化ブタ動脈の生物学的ステント処理

サイトカラシンBで処理したバルーン外傷化ブタ動脈は、他の被験薬で処理した動脈又は対照と比較した場合、より大きな管腔面積を示した。10本の大腿動脈（実施例7に記載の1回投与プロトコールに従って処理した5頭のブタの各々から2本ずつ得た動脈）を組織学的に評価した。各動脈の最大管腔面積を、BQシステムIVコンピューター処理計測学的分析システム（R & M Biometrics, Inc., Nashville, TN）によるデジタル化顕微鏡画像から測定し、算出した。さらに5頭のブタ（1頭につき動脈2本；サイトカラシンB用量 = $0.1 \mu\text{g/ml}$ ，1気圧で3分間適用；同一時点）を用いて、本実験を繰り返した。2つの実験から得たデータを合わせた。サイトカラシンB処理後3週間目の時点での管腔面積の増大が観察された。

さらに動脈の外傷化及びサイトカラシンB処理セグメントの管腔面積を、被験領域に近位の大腿動脈の正常非処理領域の管腔面積と比較した。結果は、被験領域の管腔面積が同一動脈の正常対照セグメントの面積の約2倍の大きさであることを示した。陰性対照薬、PBS及びモノクローナル抗体NR-AN-01は、同一動脈の正常対照セ

グメントと比較した場合、管腔面積の増大を全く示さないか又はわずかの減少を示した。

次にサイトカラシンB用量反応試験を、実施例7に記載の実験プロトコル後に10頭のブタで実施した。手短に言えば、2頭のブタの各々の両方の動脈を以下のいずれかの用量のサイトカラシンBで処理した： $0.0\mu\text{g}/\text{ml}$ （即ちPBS陰性対照）； $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ ； $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 。薬剤は、管腔内カテーテルにより1気圧で3分間供給し、上記の計測学的分析システムにより3週間後に評価した。処理動脈管腔面積対近位正常動脈管腔面積の比を処理面積対正常面積の%変化として確定した。 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ （ $\approx 140\%$ 増大）から $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の用量で有意の閾値作用が観察された（図14）。 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 用量は血管平滑筋細胞に有毒であると考えられた（データは示していない）。亜閾値用量（ $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ ）及び陰性対照（PBS）は、管腔面積の $\pm 20\%$ 変化を示した。これらのデータは、外傷化動脈に供給された場合、サイトカラシンBが“生物学的ステント”として作用することを示唆する。

実施例15

ラテックス粒子のカルボン酸官能基とのNR-AN-01抗体の直接抱合

抗体被覆ラテックス粒子（抗体被覆持続性放出投与形態のモデル）は、以下の無菌法を用いて得られる：

抱合：

0.01% Tween-20[®]（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート, Sigma）を含有する 0.05M ホウ酸ナトリウム 4ml に、 5mg のNR-AN-01モノクローナル抗体を含有するPBS 0.5ml を加えた。室温で攪拌しながら、この溶液に直径 $1\mu\text{m}$ のカルボキシル化ラテックス粒子 50mg を含有する水性懸濁液 2.5ml

1を加えた。その直後に、1

00mgの新たに溶解させた1 (3-ジメチルアミノプロピル) 3-エチルカルボジイミドHClを含有する0.50mlの水を撹拌しながら加える。次に溶液を撹拌しながら室温で1-2時間インキュベートする。その後反応混合物を、0.2%ゼラチン安定剤(リン酸塩/ゼラチン緩衝液)を含有する50mMリン酸塩緩衝液(pH6.6) 50mlで希釈する。混合物を40,000xgで、4-10℃で2時間遠心分離する。上清をデカントし、低レベル音波処理を10秒間用いて、ペレットをリン酸塩/ゼラチン緩衝液50ml中に再懸濁する。遠心分離を繰り返し、ペレットを2回再懸濁して、その後リン酸塩/ゼラチン緩衝液中に再懸濁する。次に標準プロトコール及びソルビタール賦形剤を用いて、接合粒子を親液化する。

特性表示：

(a) 整粒： レーザー異方性により、1 μ mより大きい粒子に関しては顕微鏡検査によって、粒子サイズ均等性を査定する。

(b) 特異的結合査定： 抱合粒子とのタンパク質/ペプチド抱合体のインキュベーション(インキュベーション混合物には遮断剤タンパク質/ペプチドが含まれないこともある)後、組織又は細胞ペレットミクロトーム薄片の組織学的検査により、平滑筋細胞との特異的結合を調べる。好ましい検出方法としては、二次抗体検定(即ち抗マウスIg)又は競合検定(即ち放射性同位元素標識化タンパク質/ペプチド接合体と関連したラジオシンチグラフによる検出)が挙げられる。

(c) タンパク質/ペプチド誘導化の程度の査定：ラテックス粒子を放射性同位元素標識化抗体で被覆して、その後被覆粒子に関連した放射能を検出することにより、この測定を実施する。

抗体被覆粒子の特性表示を表6に記載する。

表 6

NR-AN-01被覆ラテックス粒子の特性表示

粒子直径	Ab/粒子の提供	結合Ab (μ g)	Ab分子
		/5mgラテックス	/ペプチド
1.2 μ m	40,000	42	3520
1.2 μ m	84,000	66	5470
0.4 μ m	32,000	99	3160
0.4 μ m	64,000	140	4550
0.1 μ m	932	140	65

抗体接合中のpHの粒子凝集作用を表7に示す。

表 7

抗体接合中のpHの作用-粒子凝集

粒子直径	接合中のpH*	粒子凝集**	
		+Tween 20®	-Tween 20®
1.2 μ m	8.5	< 5 %	< 2.5 %
1.2 μ m	7.0	≒ 20 %	≒ 10 %
1.2 μ m	5.5	100 %	100 %
0.4 μ m	8.5	< 10 %	< 5 %
0.4 μ m	7.0	≒ 30 %	≒ 20 %
0.4 μ m	5.5	100 %	100 %
0.1 μ m	8.5	< 20 %	< 10 %
0.1 μ m	7.0	≒ 50 %	≒ 40 %
0.1 μ m	5.5	100 %	100 %

*上記のように50mM MES (pH 5.5) ; リン酸塩 (pH 7.0) ; 又はホウ酸塩 (pH 8.5) 緩衝液を使用。

**顕微鏡検査で査定する場合、0-100 %の尺度で。

これらのデータは、タンパク質又はペプチドが本発明の持続性放出投与形態と直接抱合しうることを示唆する。さらに末端カルボン酸基を有するポリ乳酸/グリコール酸粒子は本明細書に記載の手順、あるいは本明細書に記載の別の手順にし

たがって接合される。

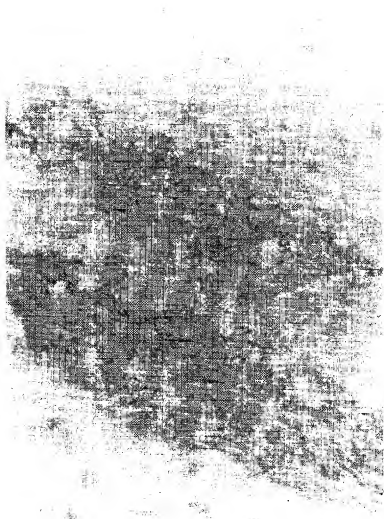
引用文献

1. Popma, J.J. et al. 1990. Factors influencing restenosis after coronary angioplasty. *Amer. J. Med.* 88:16N-24N.
2. Fanelli, C. et al. 1990. Restenosis following coronary angioplasty. *Amer. Heart Jour.* 119:357-368.
3. Johnson, D.E. et al. 1988. Coronary atherectomy: Light microscopic and immunochemical study of excised tissue (abstract). *Circulation* 78 (Suppl. 11):11-82.
4. Liu, M.W. et al. 1989. Restenosis after coronary angioplasty; Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 79:1374-1387.
5. Clowes, A.W. et al. 1985. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotic artery. *Circ. Res.* 56:139-145.
6. Goldman, B. et al. 1987. Influence of pressure on permeability of normal and diseased muscular arteries to horseradish peroxidase; A new catheter approach. *Atherosclerosis* 65:215-225.
7. Wolinsky, H. et al. 1990. Use of a perforated balloon catheter to deliver concentrated heparin into the wall of the normal canine artery. *JACC* 15 (2):475-481.
8. Nabel, E.G. et al. 1989. Recombinant gene expression in vivo within endothelial cells of the arterial wall. *Science* 244:1342-1344.
9. Middlebrook, J.L. et al. 1989. Binding of T-2 toxin to eukaryotic cell ribosomes. *Biochem. Pharm.* 38 (18):3101-3110.
10. Barbacid, M. et al. 1974. Binding of [acetyl-¹⁴C] trichodermin to the peptidyl transferase center of eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* 44:437-444.

11. Sclingemann et al. 1990. *Am. J. Pathol.* 136:1393-1405.
12. Steele P.M., Chesebro J.H., Stanson A.W., et al. 1985. Balloon angioplasty: natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ. Res.* 57:105-112.
13. Schwartz, R.S., Murphy J.G., Edwards W.D., Camrud A.R., Vliestra R.E., Holmes D.R. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. *Circulation* 1990; 82:2190-2200.
14. Bumol, T.F. and R.A. Reisfeld. 1982. Unique glycoprotein-proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1245-1249. While the Preferred embodiment of the invention has been illustrated and described, it will be appreciated that various changes can be made therein without departing from the spirit and scope of the invention.

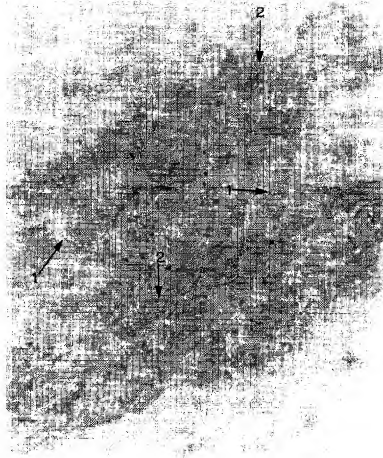
【図1】

FIG. 1



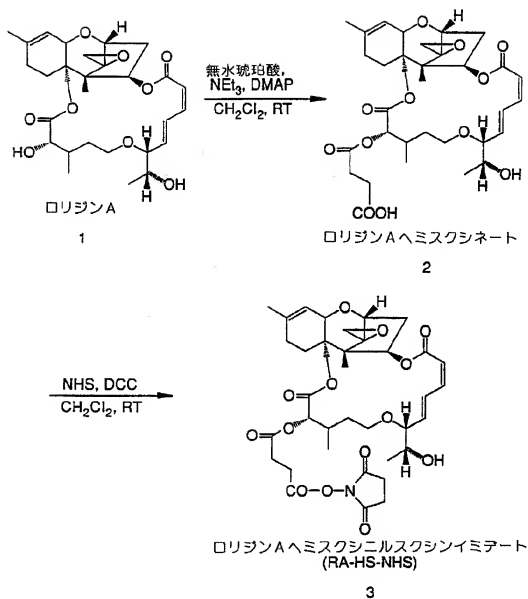
【図 1 B】

FIG. 1B



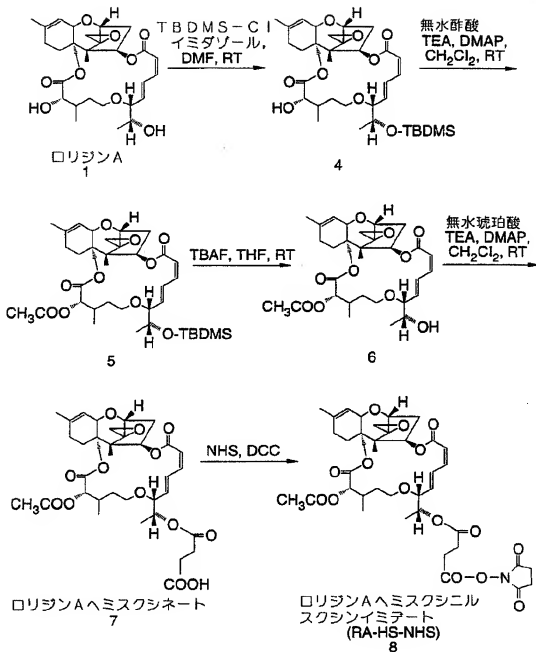
【図 2】

FIG. 2

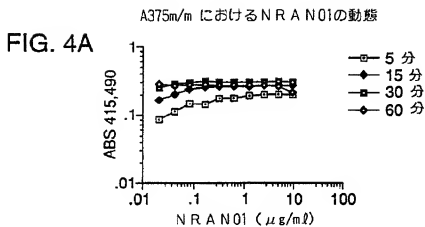


【図 3】

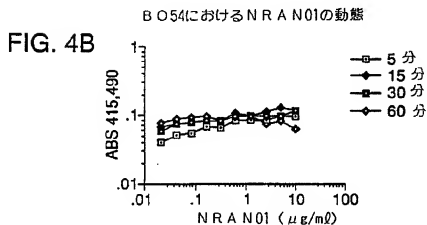
FIG. 3



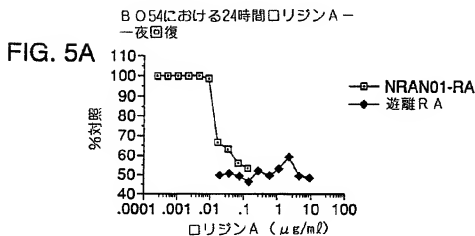
【図4A】



【図4B】



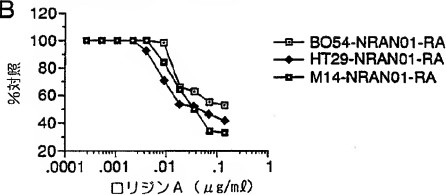
【図5A】



【図5B】

BO54, HT29, M14におけるNRAN01-
RAの24時間曝露-1夜回復

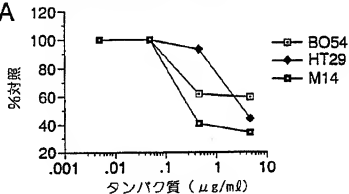
FIG. 5B



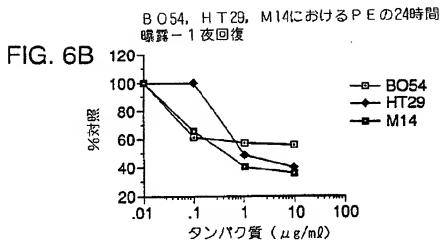
【図6A】

BO54, HT29, M14におけるNRAN01-
PEの24時間曝露-1夜回復

FIG. 6A



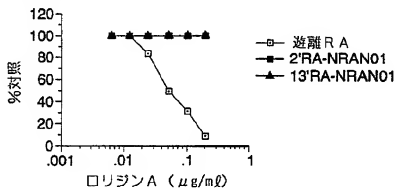
【図 6 B】



【図 7 A】

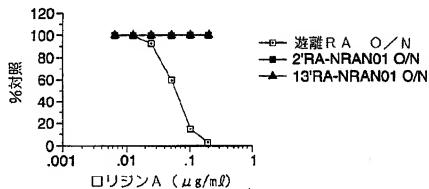
FIG. 7A

HT29における5分間ロリジンA直接[³H]ロイシノー4時間



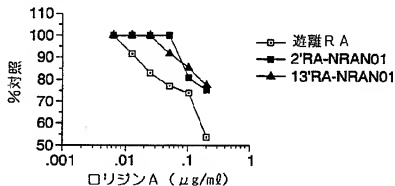
【図 7 B】

FIG. 7B

H T29における5分間ロリジンA夜回復 ($[^3\text{H}]$ ロイシンー4時間)

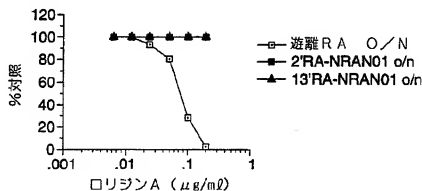
【図 7 C】

FIG. 7C

A375m/mにおける5分間ロリジンA直接 $[^3\text{H}]$ ロイシンー4時間

【図 7 D】

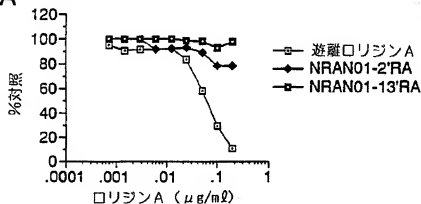
FIG. 7D

A375m/m における 5 分間ロリジン-夜回復 ($[^3\text{H}]$ ロイシン-4 時間)

【図 8 A】

FIG. 8A

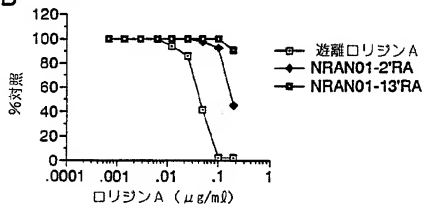
B O54 における 5 分間 R A -48 時間、回復



【図 8 B】

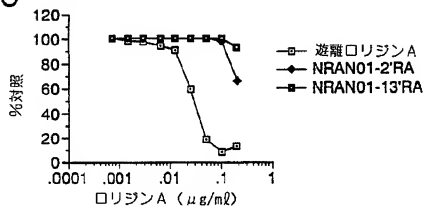
FIG. 8B

A375m/m における 5 分間 R A -48 時間、回復



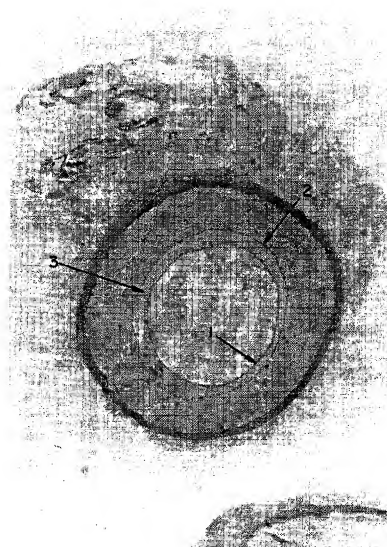
【図 8 C】

FIG. 8C HT 29における 5 分間 RA-48 時間、回復



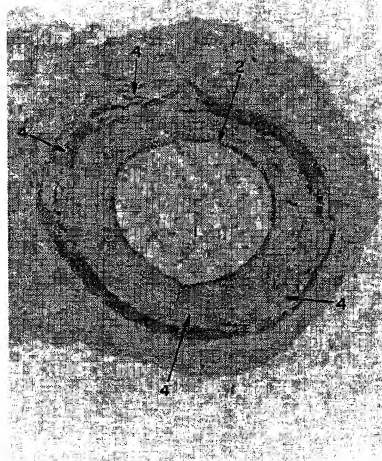
【図 9A】

FIG. 9A



【図 9B】

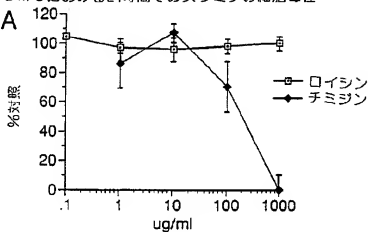
FIG. 9B



【図10A】

P SMCにおける24時間でのスラミンの細胞毒性

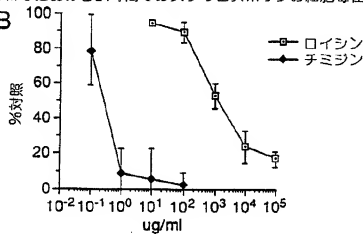
FIG. 10A



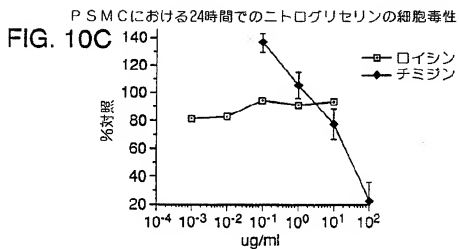
【図10B】

P SMCにおける24時間でのスタウロスポリンの細胞毒性

FIG. 10B



【図10C】



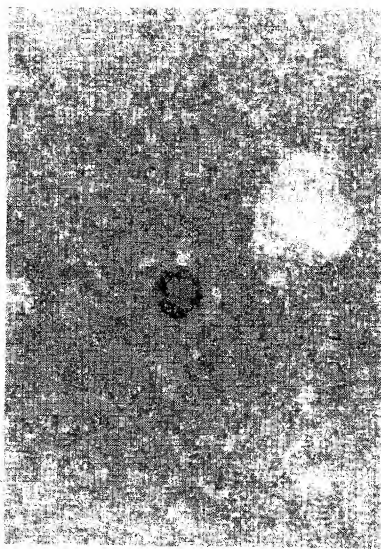
【図11】

FIG. 11



【図12】

FIG. 12



【図13】

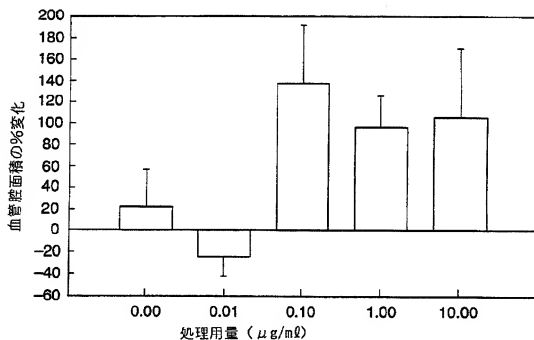
FIG. 13



【図14】

FIG. 14

サイトカラシンB処理後3週間目のブタ動脈 (N = 4) における
管腔面積比 (処理/正常) の%変化



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US94/01034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : A61K 31/535

US CL : 514/230

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 514/230

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
NONEElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US, A, 5,270,047 (Kauffman et al.) 14 December 1993. See entire document.	1-8
Y,P	US, A, 5,268,358 (Fretto) 07 December 1993. See entire document.	1-8
Y,P	US, A, 5,232,911 (Vidal) 03 August 1993. See entire document.	1-8
Y	US, A, 5,171,217 (March et al.) 15 December 1992. See entire document.	1-8
Y	US, A, 5,166,143 (Ondetti et al.) 24 November 1992. See entire document.	1-8
Y	US, A, 5,140,012 (McGovern et al.) 18 August 1992. See entire document.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	**	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the invention but cited to distinguish the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X"	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"B" earlier document published on or after the international filing date	**	documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	"A"	document number of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

27 MARCH 1994

Date of mailing of the international search report

APR 19 1994

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20531

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer:

SAMUEL BARTS

Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/D1034

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	US, A., 5,280,016 (Conrad et al.) 18 January 1994. See entire document.	1-8
Y	Budavari et al, "THE MERCK INDEX", published 1989 by MERCK & CO., INC.(N.J.), see pages 438-439, especially compound 2796.	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)*

【発行日】平成13年6月12日（2001. 6. 12）

【國際特許分類第7版】

A61K 47/48

平成13年1月24日

特約評議員 及 川 村 謙 辰

1. 事件の経緯

平成3年特許第517965号

3. 補正をする書

品名 床オムツクス モーニングメシヨシ

3. 代理人

住所 〒105-8428 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37番ビル

育和特許法律事務所 電話 03-5479-1900

次名 弁題土 (7751) 石 田 敬

4. 戦況により増強する諸球横の款 22

5. 修正片数表類

請求の範囲

5. 修正对象项目①

読者の鑑

請求の範囲を記載の通りに補正します。

3. 交付書類の目録

請求の範囲

117

附录 2

1. 哺乳類は管平滑筋細胞の収縮又は弛緩を制御するのに効果的な量の細胞内Ca²⁺を必要とする。外傷を有する哺乳類は管平滑筋細胞的にCa²⁺を必要とする。

2. 細胞を実質的に殺すことなく、外傷を有する哺乳類子宮内膜細胞の病的収縮又は移動を抑制するのに有効な量の細胞増殖抑制剤を含んで成る。管腔直径を増大又は拡張するための剤。

3) 前述の量が、離散系マトリクスを分块する習字模範解読の能力を決定しないものである。課外理1又は2に就きの解

4. 哺乳動物平滑筋細胞の増加を抑制するのに必要な低増殖基の持続放出型を含んで成る、固形剤1又は2に配製剤。

5. 前記者が持株会社である。持株者は又はその親族の所

6. 扁平持手形である。請求項1又は2に記載の形

7. カテーテルにより検出される、請求項1又は2に記載の刺

8. 外債の前もしくは後、又は外債中に投与される、請求項1又は2に記載の列。

9. 全体的に与えられる、請求項1又は2に記載の剤

30. 物質の構造が、ミクロ粒子又はナノ粒子である、請求項5に記載の剤

12. 無条件実証実験である。図表10又は2に記載の図

12. 前記の液体窒素層析法がケソール又はその融合体である。請求項1に記載の製法。

13. 前記細胞培養用薬剤が、サイトカニン又はその誘導体もしくは置換体である、請求項1に記載の剤。

14. 前記調整作業担当者前がサイトカニンB又はその誘導体もしくは類似体である。請求項13に記載の前記。

15. 血管平滑筋細胞、間質細胞、又は血管平滑筋細胞を囲む細胞マトリクスに特異的に存在することができる結合ペプチド又はタンパク質に連結されている、請求項1又は2に記載の剤。

母親的に存在することができる結合ペプチド又はタンパク質に連結された糖鎖状な型である。請求項2に記載の項。

17. 前記結合ペプチド又はタンパク質が、1日に1回90%のアクセス頻度を有するハイブリダーの細胞-群に上を分泌される細胞の融合特性を有するモノクローナル抗体である。請求項1又は16に記載の項。

18. 哺乳類止血帯循環細胞の増殖増進を抑制するために抗増殖の薬の糖鎖成分及び糖鎖成分の糖鎖受容体細胞を含んで成る。哺乳類の分泌を有する細胞に投与するための組成物。

19. 前記抗増殖増進抑制剤がタキゾール又はその類似体である。請求項2に記載の組成物。

20. 前記糖鎖増進抑制剤が、チトリクラン、又はその誘導体もしくは類似体である。請求項2に記載の組成物。

21. タキゾール又はその類似体を含んで成る。哺乳類止血帯又は再出血の治療。

22. タキゾールを含んで成る。止血薬剤に記載の項。

23. 局所投与剤の。請求項2に記載の項。

24. カテーテルを含んで成り得る。請求項2に記載の項。

25. 金身剤に使用される。請求項2に記載の項。

26. 薬に投与される。請求項2に記載の項。

27. 血管が止血血管外傷にかかっている。請求項2に記載の項。

28. 前記が止血、止血剤として用い、スプレートの投与。又は移植に投与する。請求項1又は2に記載の項。

29. 前記の薬は、止血帯循環細胞の増殖を抑制するために使用される。請求項2に記載の項。

30. アタランの薬を投与する。請求項2に記載の項。

WO9416706

Publication Title:

THERAPEUTIC INHIBITORS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

Abstract:

Methods are provided for inhibiting stenosis following vascular trauma or disease in a mammalian host, comprising administering to the host a therapeutically effective dosage of a therapeutic conjugate containing a vascular smooth muscle binding protein that associates in a specific manner with a cell surface of the vascular smooth muscle cell, coupled to a therapeutic agent dosage form that inhibits a cellular activity of the muscle cell. Methods are also provided for the direct and/or targeted delivery of therapeutic agents to vascular smooth muscle cells that cause a dilation and fixation of the vascular lumen by inhibiting smooth muscle cell contraction, thereby constituting a biological stent.

Data supplied from the esp@cenet database - <http://ep.espacenet.com>